

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Milada Grešíková

Úloha protein kinázy B v kardioprotektivních mechanismech

The role of protein kinase B in cardioprotective mechanisms

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27.8.2012

.....
Milada Grešíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, PhDr. za její podporu a vedení při psaní této práce. Zároveň bych ráda poděkovala Mgr. Petře Waskové (Arnoštové) za poskytnuté rady a také za čas, který mi věnovala. V neposlední řadě děkuji své rodině, jejíž důvěra a psychická podpora mi byly velkou pomocí.

KLÍČOVÁ SLOVA: protein kináza B, AKT, kardioprotektivní mechanismy, mitochondrie, apoptóza, energetický metabolismus

KEY WORDS: protein kinase B, AKT, cardioprotective mechanisms, mitochondria, apoptosis, energy metabolism

OBSAH:

<u>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</u>	6
<u>ABSTRAKT</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	8
1. <u>ÚVOD</u>	9
2. <u>PKB/AKT</u>	10
2.1 AKTIVACE PKB/AKT	11
2.2 ISOFORMY PKB/AKT	13
3. <u>ÚLOHA PKB/AKT V KARDIOPROTEKTIVNÍCH MECHANISMECH</u>	15
3.1 ÚLOHA PKB/AKT V OCHRANĚ MITOCHONDRIÍ	15
3.1.1 Vnitřní apoptotická dráha	16
3.1.2 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes BCL-2 proteiny	17
3.1.3 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes HK-II	18
3.1.4 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes GSK-3 β	19
3.1.5 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes Ca ²⁺ kanály	21
3.2 ÚLOHA PKB/AKT V OCHRANĚ KARDIOMYOCYTŮ	23
3.3 ÚLOHA PKB/AKT V PROLIFERACI KARDIOMYOCYTŮ	24
3.4 ÚLOHA PKB/AKT V REGULACI METABOLISMU	25
4. <u>ZÁVĚR</u>	28
5. <u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u>	30

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AIF	faktor indukující apoptózu
ANT	ADP/ATP translokáza
APAF-1	faktor aktivující apoptotické proteázy 1
AS160	AKT substrát 160
ATP	adenosintrifosfát
BAD	BCL-2 asociovaný promotér buněčné smrti
BAX	BCL-2 asociovaný X protein
BID	agonista smrti interagující s BH3 doménou
CAT	katalytická doména
CPCs	srdeční progenitorové buňky
CVDs	kardiovaskulární choroby
Cyp-D	cyclophilin D
DHPR	dihydropyridinové receptory
ECC	elektromechanické sprzęžení
eNOS	endoteliální NO syntáza
ER	endoplasmatické retikulum
EXT	rozšířený C konec
FOXO	"Forkhead O" transkripční faktory
GATA4	transkripční faktor GATA4
GLUT	glukózový transportér
GPCR	receptory sprzęžené s G proteiny
GSK-3	glykogen syntáza kináza 3
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HK	hexokináza
HM	hydrofóbní motif
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor 1
IP ₃	inositoltrifosfát
IP ₃ R	IP3 receptor
IRS-1	substrát insulinového receptoru
MCL-1	protein myeloidní buněčné linie
MOMP	propustnost vnější mitochondriální membrány

mTORC	komplex cílové molekuly pro rapamycin u savců
mtPTP	mitochondriální permeabilní pór
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ výměnný přenašeč
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T buněk
NHE	Na ⁺ /H ⁺ výměnný přenašeč
NO	oxid dusnatý
PDGF	růstový faktor odvozený z krevních destiček
PDK1	fosfoinositid dependentní kináza 1
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP	fosfatidylinositol-3-monofosfát
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PKA	protein kináza A
PKB/AKT	protein kináza B
PKC	protein kináza C
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTK	tyrosinkinázový receptor
RyR	ryanodinový receptor
SERCA	Ca ²⁺ -ATPáza sarko/endoplasmatického retikula
SR	sarkoplasmatické retikulum
VDAC	napětově závislý iontový kanál
VSMCs	buňky hladkého svalstva cév

ABSTRAKT

Kardiovaskulární choroby jsou nejčastější příčinou smrti po celém světě a patří tedy mezi nejrozšířenější onemocnění moderní civilizace. Z tohoto důvodu se současný kardiovaskulární výzkum soustředí na mechanismy, které se podílejí na ochraně srdeční tkáně. Protein kináza B (PKB/AKT) je významným regulátorem buněčných dějů a mohla by tedy hrát důležitou roli v ochranných mechanismech myokardu. K aktivaci PKB/AKT dochází přes PI3 kinázu v odpověď na řadu signálních molekul a aktivovaná PKB/AKT dále ovlivňuje mnohé signální dráhy v buňce. Jsou známy 3 isoformy PKB/AKT, které se liší svojí lokalizací a funkcí, avšak všechny mají v kardiomyocytech nepostradatelnou úlohu. PKB/AKT se podílí na regulaci mnoha buněčných funkcí, včetně proliferace, růstu buněk a energetického metabolismu, a zejména se účastní regulace apoptózy. PKB/AKT kontroluje apoptotickou dráhu přes pro- i anti-apoptotické proteiny, hexokinázu II, glykogen syntázu kinázu 3 β a přes Ca²⁺ kanály, čímž chrání mitochondrie a srdeční buňky před buněčnou smrtí. V dnešní době je proto PKB/AKT největším středem pozornosti kardiovaskulárního výzkumu a mohla by být jedním z hlavních terapeutických cílů v léčbě ischemicko-reperfúzního poškození.

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the most common cause of death worldwide and therefore it belongs to one of the most widespread diseases of modern civilization. For this reason, cardiovascular research focuses on unraveling mechanisms, which participate in protection of cardiac tissue. Protein kinase B (PKB/AKT) is an important regulator of cellular processes which could play a substantial role in protective mechanisms of the heart. There are 3 known isoforms of PKB/AKT, which differ in their localization and function, nevertheless all of them have an essential role in cardiomyocytes. PKB/AKT is involved in regulation of many cellular functions including cell proliferation, growth and energy metabolism, and it particularly takes part in the regulation of apoptosis. PKB/AKT controls the apoptotic pathway through regulation of pro- and anti-apoptotic proteins, hexokinase II, glycogen synthase kinase 3 β and Ca²⁺ channels, by which it protects mitochondria and cardiomyocytes against cell death. That is why PKB/AKT is the center of attention of today's cardiovascular research and it could become one of the main therapeutic targets in the treatment of ischemia-reperfusion injury.

1. ÚVOD

Kardiovaskulární choroby (CVDs, cardiovascular disease) jsou nejčastější příčinou smrti po celém světě a patří tedy mezi nejrozšířenější onemocnění moderní civilizace. Na základě statistických údajů Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization, <http://www.who.int/en/>) zemřelo v roce 2008 na CVDs okolo 17,3 milionů lidí, přičemž 7,3 milionu lidí zemřelo na onemocnění věnčitých tepen a 6,2 milionu lidí podlehl infarktu myokardu. CVDs tak mají na svědomí okolo 30% všech úmrtí na celém světě. Bohužel ani prognózy do budoucnosti nejsou příliš optimistické. Vzhledem k stále se zhoršujícímu životnímu stylu populace není překvapující, že podle propočtů by v roce 2030 mohlo na CVDs zemřít až 23,6 milionů lidí. Z tohoto důvodu se současný kardiovaskulární výzkum soustředí na mechanismy, které se podílejí na ochraně srdeční tkáně a zmírňují tak následky ischemicko-reperfúzního poškození myokardu.

Ischemie myokardu je nejčastěji způsobena aterosklerotickými pláty zmenšující průměr cév, což má za následek nedostatečné prokrvení orgánu a snížený přísun kyslíku. Tato ischemie může být ale pouze přechodná. Trvalá ischemie myokardu, kdy je céva uzavřena nejčastěji krevní sraženinou, omezí průtok krve a příjem kyslíku natolik, že to vede až k infarktu myokardu. V této fázi je pak nutné co nejrychleji obnovit průtok krve. V klinické praxi je rychlá reperfúze jediným způsobem jak zabránit dalším poškozením, zejména mozku, ale zároveň jsou studie, které poukazují, že i reperfúze může vyvolat další poškození srdeční tkáně včetně komorových arytmií.

Bylo zjištěno, že fyzický trénink, kalorická restrikce, adaptace na hypoxii, ale i ischemický “preconditioning” zvyšují odolnost srdce. Ischemický “preconditioning” byl poprvé popsán v roce 1986, kdy bylo pozorováno, že srdce, které bylo střídavě vystavené krátkým periodám ischemie a reperfúze mělo zvýšenou toleranci vůči ischemicko-reperfúznímu poškození, což se projevilo menším poškozením tkáně (Murry, Jennings, a Reimer 1986).

Adaptace na hypoxii má rovněž protektivní účinky a zvyšuje odolnost srdce vůči ischemicko-reperfúznímu poškození. Statistické údaje ukázaly, že výskyt infarktu myokardu je nižší u lidí žijících ve vyšších nadmořských výškách (Hurtado 1960), což bylo následně potvrzeno i experimentálními metodami (Poupa et al. 1966).

V neposlední řadě zvyšuje odolnost myokardu vůči ischemicko-reperfúznímu poškození samotný fyzický trénink (Powers et al. 1998; Ding et al. 2004; Kavazis et al. 2009;

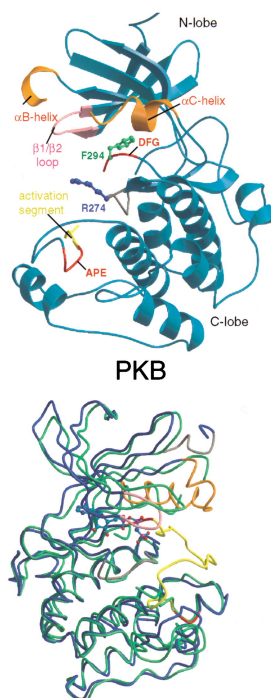
Calvert et al. 2011), avšak molekulární podstata ochranných mechanismů není ještě zcela známa.

Protein kináza B/AKT je ve většině těchto fyziologických adaptací významným regulátorem a může tedy hrát důležitou roli v ochranných mechanismech myokardu vůči stresovým faktorům (Aikawa et al. 2000; Armstrong 2004). Proto je v dnešní době největším středem pozornosti kardiovaskulárního výzkumu.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dostupné informace, které se o protein kináze B/AKT nashromáždily za 25 let jejího výzkumu. Hlavním námětem je úloha tohoto enzymu v buněčných signálních kaskádách, které hrají roli v kardioprotektivních mechanismech.

2. PKB/AKT

Protein kináza B (PKB), častěji známá také pod názvem AKT kináza, byla objevena v roce 1987 jako proto-onkogen v myším retroviru leukemie AKT8 (Bellacosa et al. 1991; Staal 1987) a jako homolog protein kinázy C (PKC) a A (PKA) (Jones et al. 1991). Podílí se na regulaci mnoha buněčných funkcí, například na proliferaci a růstu buněk, apoptóze, energetickém metabolismu, přežití buněk a lékové rezistenci (Nicholson a Anderson 2002; Manning a Cantley 2007; LoPiccolo et al. 2008), a proto je právem nazývána všudypřítomným bodem uprostřed křížovatek reakcí buněčné biologie.



Obrázek 1 Struktura PKB/AKT (J. Yang et al. 2002)

2.1 AKTIVACE PKB/AKT

K dosažení účinné ochrany srdce je nezbytné zajistit nejen přežití kardiomyocytů, ale je důležité zachovat i jejich funkci. Signalizační dráha přes PKB/AKT je jednou z multifunkčních drah, která chrání srdeční buňky před buněčnou smrtí, ale také usiluje o udržení jejich funkčnosti (Matsui a Rosenzweig 2005; Matsui et al. 2001).

K dispozici je mnoho studií, které potvrzují, že PKB/AKT chrání kardiomyocyty před buněčnou smrtí způsobenou mnoha různými patologickými procesy, jako je například ischemicko-reperfúzní poškození (Miao et al. 2000), hluboká hypoxie (koncentrace $O_2 < 0,1\%$) (Matsui et al. 1999), hypoglykémie (Ricci, Jong, a Schaffer 2008) a různé toxické látky (Negoro et al. 2001).

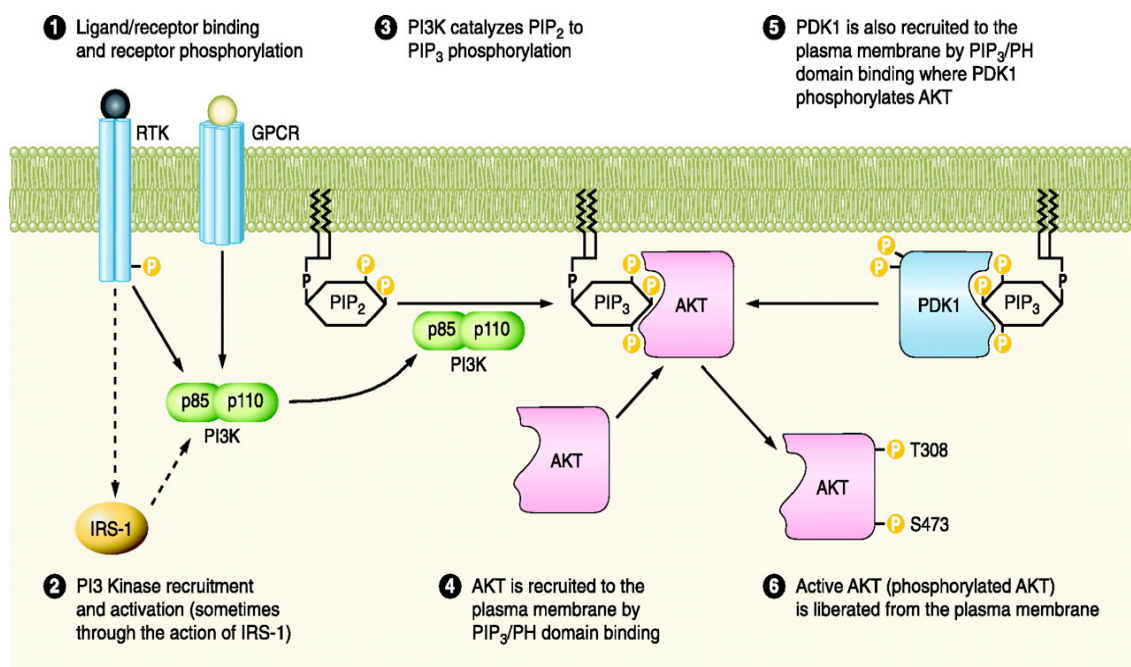
Aktivace PKB/AKT začíná u fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase), která může být aktivována tyrosinkinázovými receptory (RTK, receptor tyrosin kinase) (Alessi et al. 1996), receptory spřaženými s G proteinem (GPCR, G protein-coupled receptor) (Chesley et al. 2000) nebo přes glykoprotein 130 (Kuwahara et al. 2000; Craig et al. 2001) v odpověď na rozmanité signální molekuly, jako jsou např. hormony, cytokiny, integriny a růstové faktory (viz. dále).

Mezi nejčastější signální molekuly aktivující signalizační dráhu PI3K/AKT patří například insulin (Aikawa et al. 2000; Gao et al. 2002), kardiotropin (Kuwahara et al. 2000; Brar et al. 2001), insulinu-podobný růstový faktor 1 (IGF-1, insulin-like growth factor 1) (Q. Li et al. 1997; Yamashita et al. 2001), růstový faktor odvozený z krevních destiček (PDGF, platelet derived growth factor) (Hsieh et al. 2006), estrogen (Patten et al. 2004; Pedram et al. 2005), endotelin (Schorlemmer, Matter, a Shohet 2008) a kalcineurin (Heineke et al. 2010).

Vlivem aktivace PI3 kinázy dojde ke zvýšení koncentrace fosfolipidů, fosfatidylinositol-3-monofosfátu (PIP, phosphatidylinositol 3-phosphate), fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) a fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu (PIP₃, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), což aktivuje translokaci PKB/AKT do cytoplasmatické membrány. PIP₃ se naváže na PKB/AKT přes PH doménu a to má za následek, že PKB/AKT změní svojí konformaci. Tato změna konformace pak dovolí fosfoinositid dependentní protein kináze 1 (PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1) fosforylovat PKB/AKT na Thr³⁰⁸ (Milburn et al. 2003). Po této fosforylaci dojde k disociaci PKB/AKT od membrány a takto aktivovaná se přesouvá zpátky do cytoplasmy nebo se

akumuluje v jádře. K plné aktivaci je však zapotřebí ještě fosforylace na Ser⁴⁷³ nacházejícího se v C-terminálním hydrofóbním motivu PKB/AKT pomocí komplexu 2 cílové molekuly pro rapamycin u savců (mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2) (Sarbasov et al. 2005).

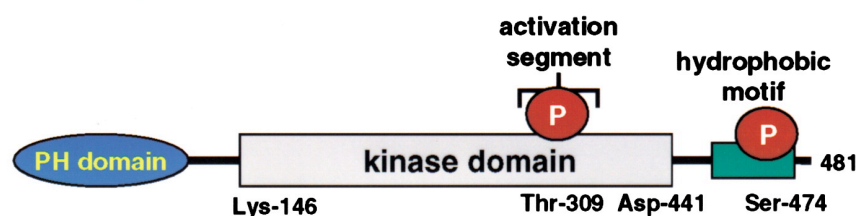
Plně aktivovaná PKB/AKT je následně schopná fosforylovat další kinázy v signálních drahách, jako například glykogen syntáza kinázu 3 (GSK-3, glycogen synthase kinase), která se účastní syntézy glykogenu (Embi, Rylatt, a Cohen 1980; Cross et al. 1995), ale také proteiny hrající úlohu v apoptóze, jako je BAD (Datta et al. 1997), či transkripční faktory FOXO a mnoho dalších cílových molekul, které se podílejí na zachování mitochondriální integrity, odvrácení apoptózy a glukózovém metabolismu (viz dále) (Franke 2008).



Obrázek 2: Aktivace PKB/AKT Schematický diagram zobrazující kroky vedoucí k fosforylaci a aktivaci protein kinázy B. Vazba ligandu na receptor a jeho fosforylace (1.) vede k aktivaci PI3K (někdy přes IRS-1) (2.), která následně katalyzuje fosforylaci PIP₂ na PIP₃ (3.). PKB/AKT se nato přesune k cytoplasmatické membráně, kde se váže přes PH doménu na PIP₃ (4.). K membráně se přes PIP₃/PH vazbu váže i PDK1, která pak může fosforylovat PKB/AKT (5.). Aktivní (fosforylovaná) PKB/AKT je propuštěna zpátky do cytoplasmy, kde fosforyluje různé cílové molekuly. GPCR, receptor spážený s G proteinem (G protein-coupled receptor); RTK, tyrosinkinázový receptor (receptor tyrosine kinase); IRS-1, substrát insulinového receptoru (insulin receptor substrate 1); PI3K, fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase); PDK1, fosfoinositid-dependentní kináza 1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1); PIP₂, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate); PIP₃, fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate); PH, plekstrin homologická doména. (M. A. Sussman et al. 2011)

2.2 ISOFORMY PKB/AKT

Protein kináza B/AKT patří do rodiny AGC kináz a je příbuzná AMP/GMP kinázám a protein kináze C (Kumar a Madison 2005). V dnešní době již víme, že v savcích buňkách se vyskytují 3 isoformy protein kinázy B/AKT: PKB α (AKT1), PKB β (AKT2) a PKB γ (AKT3). Každá z isoform obsahuje N-terminální PH doménu (pleckstrin homology domain), která zprostředkovává vazbu PKB/AKT na fosfatidylinositoly (Lietzke et al. 2000), dále centrální katalytickou doménu (CAT, catalytic domain) a rozšířený C-konec (EXT, C-terminal extension) obsahující regulační hydrofóbní motiv (HM, hydrophobic motif). PH domény PKB/AKT isoform jsou přibližně z 80% homologické, CAT domény jsou identické z 90% a EXT domény ze 70% (Kumar a Madison 2005).



Obrázek 3 Schématická struktura PKB/AKT (J. Yang et al. 2002)

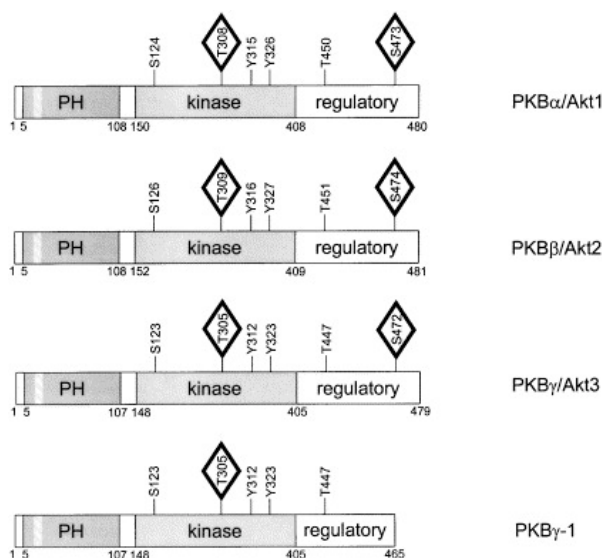
Nejrozšířenější je isoforma PKB α /AKT1, která se vyskytuje ve většině tkání, mezi jinými je nejvíce exprimována v srdci, plicích a mozku (Coffer a Woodgett 1991). Isoforma PKB β /AKT2 se především nalézá v tkáních závislých na insulinu s rozvinutým metabolismem glukózy, jako je například hnědá tuková tkáň, kosterní svalstvo, ale i játra (Altomare et al. 1998). Isoforma PKB γ /AKT3 se vyskytuje hlavně v mozku, plicích a ledvinách, přičemž její exprese je větší u novorozenců než u dospělých jedinců (Brodbeck, Cron, a Hemmings 1999; Z.-Z. Yang et al. 2005).

Pokusy na myších s delecí PKB/AKT genů odhalily odlišné funkce PKB/AKT isoform. Myši s globální nedostatečností genu *Akt1* (*Akt1*^{-/-}) se projevují menším vzrůstem oproti kontrolním myším ("wild-type"). Z toho lze soudit, že PKB α /AKT1 se podílí na regulaci zárodečného i postnatálního růstu (Cho, Thorvaldsen, et al. 2001). PKB β /AKT2 je naopak důležitá pro zachování homeostázy glukózy a její nedostatečnost může vést až k vyvolání diabetu mellitu (Cho, Mu, et al. 2001). Obě isoformy PKB α /AKT1 a PKB γ /AKT3 hrají pravděpodobně také důležitou roli ve vývoji a funkci kardiovaskulárního systému, neboť myši s delecemi *Akt1*^{-/-} a *Akt3*^{+/-} podlehly náhlému srdečnímu selhání, které bylo zřejmě způsobeno špatným vývojem funkce kardiomyocytů a srdce (Z.-Z. Yang et al. 2005). PKB γ /AKT3 je rovněž nezbytná pro postnatální rozvoj mozku, ale zároveň bylo zjištěno, že nemá významný vliv na metabolismus glukózy (Tschopp et al. 2005).

Jednotlivé isoformy PKB/AKT jsou v buňce různě lokalizovány v souvislosti s jejich funkcí. Isoforma PKB α /AKT1 je převážně lokalizována v cytoplasmě a část se nachází v blízkosti plasmatické membrány. Isoforma PKB β /AKT2 se nejvíce vyskytuje v okolí mitochondrie a malá populace této isoformy se také nachází v okolí Golgiho aparátu. Zjištění, že PKB β /AKT2 je isoformou lokalizovanou v blízkosti mitochondrie, je v souladu s její funkcí v regulaci energetického metabolismu a poukazuje na její ochrannou funkci v buňkách. Isoforma PKB γ /AKT3 je zatím jedinnou isoformou, u které je prokázána translokace do jádra. Tyto fakta nabízejí otázky zabývající se aktivací jednotlivých isoform, kdy isoformy PKB β /AKT2 a PKB γ /AKT3 mohou být aktivovány jiným způsobem než PKB α /AKT1 (Santi a Lee 2010).

V srdci se nacházejí všechny tři isoformy protein kinázy B/AKT a majoritní zastoupení mají PKB α /AKT1 a PKB β /AKT2 (Matsui a Rosenzweig 2005). Zatímco isoforma PKB β /AKT2 je v srdci spojována s přežitím kardiomyocytů v případě ischemického poškození a udržení homeostázy metabolismu glukózy (DeBosch, Sambandam, et al. 2006), PKB α /AKT1 je, vedle proliferační a ochranné funkce, navíc nepostradatelná pro fyziologický růst stimulovaný IGF-1 nebo fyzickou zátěží. Z tohoto důvodu by faktory zvyšující aktivitu PKB α /AKT1 v srdci mohly v budoucnosti sloužit i k léčebným účelům (DeBosch, Treskov, et al. 2006; Chang et al. 2010). Isoforma PKB γ /AKT3 také podporuje růst srdce a zastává i kardioprotektivní funkci, nicméně nadměrná exprese PKB γ /AKT3 vede k maladadaptivní hypertrofii (Taniyama et al. 2005).

V dostupné literatuře většinou není zmínka o zapojení konkrétních isoform v jednotlivých drahách, a proto je zde nutný další vědecký výzkum pro potvrzení známých údajů.



Obrázek 4 Struktura isoform PKB/AKT (Nicholson a Anderson 2002)

3. ÚLOHA PKB/AKT V KARDIOPROTEKTIVNÍCH MECHANISMECH

PKB/AKT v buňce ovlivňuje mnoho buněčných procesů (viz Obrázek 5 a 6), které hrají významnou úlohu v protektivních mechanismech. Mezi tyto procesy patří mimo jiné i energetický metabolismus, který je regulován pomocí PKB/AKT hlavně přes glukózový transportér 4 (GLUT4, glucose transporter 4), čímž je regulován vstup glukózy do buněk (Calera et al. 1998) a její další využití v glykolýze či k syntéze glykogenu. Zároveň se PKB/AKT podílí na regulaci transkripce přes fosforylaci některých transkripčních faktorů rodiny “Forkhead”, a tak řídí proliferaci, růst i přežití buňky (Evans-Anderson, Alfieri, a Yutzey 2008). PKB/AKT také reguluje apoptotickou dráhu přes některé pro- i anti-apoptotické proteiny (BCL-2, BAD, BAX) a tak chrání mitochondrie a buňku před vylitím cytochromu c do cytoplasmy (A. Gross et al. 1998; Datta et al. 1997).

V několika následujících podkapitolách je zpracován detailnější přehled vybraných dějů.

3.1 ÚLOHA PKB/AKT V OCHRANĚ MITOCHONDRÍ

Mitochondrie jsou nepostradatelné buněčné organely produkující energii oxidativní fosforylací. Tato energie je ve formě ATP využita v rozmanitých buněčných procesech (Dyall, Brown, a Johnson 2004). Současně mají mitochondrie důležitou funkci v regulaci buněčné smrti (Kroemer, Galluzzi, a Brenner 2007). Ve svalových buňkách jsou tyto buněčné organely zvláště četné, jsou lokalizovány pod sarkolemou, mezi myofibrilami a v okolí jádra, což jim dává strategickou pozici pro distribuci ATP (Andrienko et al. 2003). Srdce má značnou spotřebu energie, jelikož je zatíženo po celou dobu života každého živočišného organismu, a tak efektivní distribuce ATP je zde velmi důležitá (Lopaschuk et al. 2010).

Je známo, že existují tři hlavní apoptotické dráhy (Newmeyer a Ferguson-Miller 2003; Weiss et al. 2003). První je dráha receptoru smrti (neboli vnější), která je spuštěna aktivací receptorů na povrchu buňky. Tyto receptory váží ligandy, které jsou exprimovány na jiných buňkách. Nejznámějším receptorem smrti je Fas receptor, na který se váže Fas ligand (Bishopric et al. 2001). Další apoptotickou dráhou je dráha endoplasmatického retikula (ER), která je aktivována značnou akumulací nesložených proteinů. Pokud je stres na ER způsobený tímto hromaděním proteinů příliš velký, dojde ke spuštění apoptózy (Gorman et al. 2012).

Poslední dráhou je vnitřní apoptotická dráha, která je v srdci hlavním aktivátorem buněčné smrti indukované stresem (Shigeki Miyamoto, Rubio, a Sussman 2009).

3.1.1 Vnitřní apoptotická dráha

Vnitřní apoptotická dráha je spuštěna po přijetí signálu z buňky samotné, například v důsledku poškození DNA, a má za následek nerovnováhu energetického metabolismu a zvýšenou produkci volných kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species), což následně vede k narušení integrity mitochondriálních membrán. Jakmile je integrita vnější membrány mitochondrie narušena, dojde k výlevu aktivátorů apoptotické dráhy, mezi které patří například i cytochrom c, faktor indukující apoptózu (AIF, apoptosis inducing factor) a různé proteiny degradující inhibitory kaspáz (např. Smac/Diablo, HtrA2/Omi) (Reed a Paternostro 1999; Reed 2008).

Důležitými regulátory této vnitřní apoptotické dráhy jsou proteiny rodiny BCL-2 a také mtPT pór (mtPTP, mitochondrial permeability transition pore).

Rodina proteinů BCL-2 hraje centrální roli v mitochondriální apoptotické dráze a obsahuje jak anti-apoptotické tak i pro-apoptotické proteiny. Členové této rodiny obsahují BCL-2 homologické domény (BH, BCL-2 homology domain), přičemž anti-apoptotické proteiny mají všechny 4 segmenty (BH1-4), zatímco u pro-apoptotických proteinů chybí BH4 doména, která je zodpovědná za jejich ochranný efekt (Chen et al. 2002). Pro-apoptotické BCL-2 proteiny lze rozdělit do dvou podkategorií, “multidoménové” se zachovanými sekvencemi v doménách BH1-3 a proteiny pouze s doménou BH3 (BH3-only proteins). Mezi “multidoménové” pro-apoptotické BCL-2 proteiny patří například BAX a BAK, naopak BAD se řadí mezi BCL-2 proteiny obsahující pouze BH3 doménu (Scorrano a Korsmeyer 2003).

Pro-apoptotické proteiny BAX a BAK zapříčiňují propustnost vnější mitochondriální membrány (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization), čímž se do cytoplasmu uvolní proteiny aktivující kaspázy a jiné mediátory buněčné smrti. Anti-apoptotickým účinkem jsou známé proteiny BCL-2 a BCL-xL, které se naopak podílí na zachování celistvosti vnější mitochondriální membrány (Reed 2008).

Členové proteinové rodiny BCL-2 se také podílí na tvorbě mtPT póru. Z literatury je známo, že mtPTP je proteinový komplex skládající se hlavně z napěťově závislého iontového kanálu (VDAC, voltage-dependent anion channel), který je lokalizován na vnější mitochondriální membráně, dále se skládá z ADP/ATP translokázy (ANT, adenine nucleotide translocase) ve vnitřní mitochondriální membráně a z cyclophilinu D (Cyp-D) lokalizovaném

v matrix mitochondrie (pro přehled (Rasola a Bernardi 2007)). Nicméně v poslední době byl tento model zpochybněn. Zjistilo se, že delece genů pro VDAC (*Vdac1*-, *Vdac3*- a *Vdac1/Vdac3*-) nebo “knockdown” VDAC2 isoformy nezajistilo ochranu mitochondrií proti otevření mtPT póru (Baines et al. 2007). Ke stejným závěrům dospěli i Kokoszka et al. (2004), kteří pozorovali, že delece genů pro ANT (*Ant1*- a *Ant2*-) také vedla k otevření mtPTP a vylití cytochromu c (Kokoszka et al. 2004). Rovněž se více zkoumal anti-apoptotický efekt Cyp-D, kdy Cyp-D pravděpodobně slouží spíše jako regulátor otevření mtPTP než jako jeho přímá součást (Eliseev et al. 2009; Rasola a Bernardi 2007).

Vzhledem k tomu, že mtPT pór je komplex mnoha molekul, nejenom výše zmíněných, tak se na regulaci jeho otevření pravděpodobně budou podílet i další proteiny. Na formování mtPT póru se mohou také podílet fosfolipidy v mitochondriálních membránách, jako například kardiolipin, který se za apoptotického stavu přesouvá z vnitřní do vnější mitochondriální membrány, a spekuluje se o tom, že by se mohl podílet právě na transportu cytochromu c (Korytowski et al. 2011).

Je tedy zapotřebí dalšího výzkumu pro potvrzení těchto odhadů i pro nalezení dalších mechanismů, na kterých závisí otevření mtPTP.

3.1.2 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes BCL-2 proteiny

Apoptóza je úzce regulovaná BCL-2 proteiny. Protein BAD byl prvním objeveným proteinem fosforylovaným PKB/AKT (Datta et al. 1997). Nefosforylovaný BAD tvoří heterodimery s anti-apoptotickými BCL-2 proteiny (např. BCL-xL, BCL-2), a tak podporuje apoptózu neutralizací jejich protektivních účinků. Po fosforylaci protein kinázou B/AKT na Ser¹³⁶ BAD interaguje s 14-3-3 proteiny, a tak nemůže bránit obranné signalizaci (Julian 2004).

Dalším pro-apoptotickým proteinem regulovaným PKB/AKT je protein BAX. BAX je za normálního stavu lokalizovaný v cytosolu, ale v případě apoptotického stimulu se translokuje do vnější mitochondriální membrány, kde tvoří dimery až oligomery, což vede k formování pórů a vylití pro-apoptotických faktorů z intermembránového prostoru včetně cytochromu c do cytosolu. V cytoplasmě dojde k navázání cytochromu c na protein APAF-1, který následně oligomerizuje a vytvoří tak apoptosom aktivující pro-kaspázy-9, které aktivují další kaspázy, což nakonec vede k buněčné smrti (P. Li et al. 1997). Fosforylace proteinu BAX na Ser¹⁸⁴ pomocí PKB/AKT navodí takovou změnu konformace, která je nevýhodná pro

interakci s mitochondriální membránou a tím PKB/AKT zabrání přesunu BAX do mitochondriální membrány (A. Gross et al. 1998; Yamaguchi a Wang 2001).

Protein kináza B/AKT vedle fosforylace BCL-2 proteinů zároveň ovlivňuje i jejich genovou expresi. Příkladem je zvýšení exprese anti-apoptotického BCL-xL v reakci na IGF-1 přes PI3K/AKT signalizační dráhu (Uchiyama, Maulik, a Das 2004).

Můžeme říci, že v literatuře najdeme hojné množství důkazů ohledně PKB/AKT zajišťující zachování integrity mitochondriálních membrán přes transkripční, translační i post-translační kontrolu rodiny BCL-2 proteinů (Shigeki Miyamoto, Murphy, a Brown 2009), ale většina těchto regulačních mechanismů byla prokázána pouze *in vitro* na buněčných kulturách. Toto téma je tedy stále otevřené dalším výzkumům, které by potvrdily výše uvedené procesy *in vivo*.

3.1.4 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes HK-II

Protein kináza B/AKT, jak již bylo řečeno, plní důležitou roli v regulaci metabolismu i proliferace. Pokud bychom vzali v úvahu, že mnoho podnětů pro buněčný růst a proliferaci, které vyžadují velké množství energie, je zprostředkováno signální dráhou PI3K/AKT, potom je funkce PKB/AKT v metabolických i anti-apoptotických procesech logickým spojením. Energie vznikající činností mitochondrie je využívána jak během buněčného růstu, tak i pro proliferaci buňky. PKB/AKT oba dva procesy reguluje přes fosforylaci, čímž ovlivňuje spotřebu ATP v buňce. Dostupnost energeticky bohatých substrátů je tak klíčové pro oba zmíněné procesy, ale i pro anti-apoptotické působení PKB/AKT. Jedna z posledních teorií tak postuluje, že metabolická funkce PKB/AKT předcházela a časem se vyvinula v další funkce posilující přežití buňky včetně anti-apoptotické signalizace PKB/AKT chránící mitochondrii přes hexokinázy (M. A. Sussman et al. 2011).

Hexokináza (HK) je enzym katalyzující první krok glykolýzy, kdy fosforyluje glukózu na glukózu-6-fosfát. Je tedy významně důležitým proteinem buněčného metabolismu ovlivňující vstup glukózy do buňky (Shulman, Bloch, a Rothman 1995; Fueger 2005). Nicméně se množí důkazy o zapojení HK i v obranných mechanismech buňky (viz dále).

Hexokináza se vyskytuje ve 4 isoformách (I, II, III, IV), přičemž HK-I je všeobecně exprimovaná ve všech tkáních, zatímco HK-II je dominantní isoformou exprimovanou v tkáních citlivých na insulin, jako je například kosterní a srdeční svalstvo a většina rakovinných buněk (Wilson 2003; Postic et al. 1994). HK-I a HK-II jsou také jediné, které se mohou vázat přes N-konec do vnější membrány mitochondrie, kde interagují s VDAC

(Pastorino, Hoek, a Shulga 2005). Tyto hexokinázy mají podle různých zdrojů protektivní účinky a velký vliv na udržení neporušenosti membrán mitochondrie u různých buněčných typů (Ahmad et al. 2002; L. Sun et al. 2007). Jsou k dispozici důkazy, že hexokinázy mají inhibiční účinek na otevření mtPT póru (Azoulay-Zohar et al. 2004). Například bylo potvrzeno, že odpojení HK-II od mitochondrie vede ke zvýšené citlivosti fibroblastů k navození buněčné smrti (Nathan Majewski et al. 2004) a je významnou hnací silou k vyvolání apoptózy přes otevření mtPTP u Hela buněk (Chiara et al. 2008).

Avšak sekvencí pro fosforylaci protein kinázou B/AKT disponuje pouze HK-II, a tak distribuce hexokinázy přes signalizační dráhu PKB/AKT bude pravděpodobně specifická pouze pro HK-II (S Miyamoto, Murphy, a Brown 2007). Bylo dokázáno, že PKB/AKT se po své aktivaci akumuluje v blízkosti mitochondrie a fosforyluje HK-II. Fosforylovaná HK-II více asociuje s mitochondrií a chrání tak mitochondriální membránu před depolarizací způsobenou Ca^{2+} nebo H_2O_2 , což by následně vedlo k otevření mtPTP, vyjití cytochromu c a spuštění apoptózy (S Miyamoto, Murphy, a Brown 2007).

HK-II, stejně jako PKB/AKT, interaguje s některými apoptotickými BCL-2 proteiny. Bylo dokázáno, že HK-II brání navázání pro-apoptotického proteinu BAX do mitochondriální membrány, a tak předchází vyjití cytochromu c z intermembránového prostoru (Pastorino, Shulga, a Hoek 2002). Zvýšená aktivita HK-II navozená PKB/AKT rovněž negativně reguluje apoptózu vyvolanou pro-apoptotickým BCL-2 proteinem BID, který po proteolytické úpravě kaspázami 8 usnadňuje vazbu BAX a BAK na mitochondriální membránu (N. Majewski et al. 2003).

Vliv HK-II na BCL-2 proteiny ještě nebyl dokázán v srdci, ale je zřejmé, že dráha PKB/AKT – HK-II demonstruje své protektivní účiny přes ochranu celistvosti membrán mitochondrií pomocí různých cílových molekul.

3.1.5 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes GSK-3 β

Glykogen syntáza kináza 3 je Ser/Thr protein kináza, která byla nejdříve popsána v souvislosti s regulací metabolismu glukózy a syntézy glykogenu přes fosforylaci glykogen syntázy, kterou tak inaktivuje (Embi, Rylatt, a Cohen 1980). Nicméně GSK-3 svou činností ovlivňuje i další buněčné procesy včetně růstu buněk, translace i transkripce (pro přehled (Doble a Woodgett 2003)).

V současnosti známe 2 isoformy GSK-3 (GSK-3 α a GSK-3 β), obě mohou být fosforylovány PKB/AKT (GSK-3 α na Ser²¹ a GSK-3 β na Ser⁹) a tak inhibovány (Cross et al.

1995). Nejvíce studovanou isoformou v souvislosti s poškozením myokardu je GSK-3 β . GSK-3 β v kardiomyocytech fosforyluje například β -katenin (Haq et al. 2003), myokardin (Badorff et al. 2005), NFAT (Beals et al. 1997) nebo GATA4 (Morisco et al. 2001), a tak negativně reguluje genovou expresi a syntézu proteinů a stává se tak důležitým negativním regulátorem srdeční hypertrofie.

Inhibice GSK-3 β fosforylací protein kinázou B/AKT má podle několika studií kardioprotektivní účinky. Například kardioprotektivní účinky “preconditioningu” mimo jiné souvisí i s inaktivací GSK-3 β přes signalizační dráhu PI3K/AKT (Tong et al. 2002). Nedávný výzkum také prokázal, že fosforylace GSK-3 β na Ser⁹ protein kinázou B/AKT vede k inhibici otevření mtPT póru a je tak naopak důležitá v ochranném mechanismu “postconditioningu” (Gomez et al. 2008).

GSK-3 β byla rovněž studována v souvislosti s BCL-2 proteiny. Jedním z proteinů regulovaných GSK-3 β je anti-apoptotický protein MCL-1. GSK-3 β tento protein fosforyluje, což vede k degradaci MCL-1 v proteasomu. Tím je následně usnadněno spuštění apoptózy přes permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Inhibice GSK-3 β pomocí PKB/AKT stabilizuje MCL-1, a tak má ochranný účinek (Maurer et al. 2006) a mohlo by to být novou strategií v ochraně srdečních buněk proti apoptóze (Hirotsu et al. 2007).

Aktivovaná GSK-3 β také napomáhá navázání BAX na VDAC, tím že VDAC fosforyluje, čímž znemožní navázání HK-II, která tak chrání integritu mitochondrií (viz výše). Po fosforylaci PKB/AKT je GSK-3 β inhibována, a tak nemůže bránit interakci HK-II s VDAC (Pastorino, Hoek, a Shulga 2005).

Zároveň se ale objevují studie popírající význam GSK-3 v kardioprotekci. Nedávné pokusy ukázaly, že protektivní účinky “preconditioningu” a “postconditioningu” proti ischemicko-reperfúznímu poškození jsou nezávislé na GSK-3. V tomto pokusu byly použity “knockin” myši, ve kterých byly změněny fosforylační místa protein kinázy B/AKT ze Ser na Ala, a tak byla znemožněna inhibice GSK-3 přes PKB/AKT. Tato změna však neměla na ochranné účinky “preconditioningu” ani “postconditioningu” vliv (Nishino et al. 2008). Nicméně podle mého názoru výše zmíněné studie poukazují na značnou složitost anti-apoptotických dějů, které nezávisí pouze na jednom proteinu, ale jsou souhrou několika signálních drah a procesů. Zároveň je důležité si uvědomit, že použitím různých experimentálních modelů a metod můžeme také dospět k odlišným výsledkům.

Závěrem je nutno říci, že i přes značné množství dat potvrzující protektivní účinek PKB/AKT přes fosforylaci GSK-3 β , tento mechanismus stále ještě není dokonale popsán a je nutný další výzkum k osvětlení jednotlivých kroků této dráhy.

3.1.6 Úloha PKB/AKT v ochraně mitochondrií přes Ca^{2+} kanály

Vápenaté ionty, patřící do skupiny druhých posílů, mají v buňce významnou úlohu. Vzestup koncentrace cytosolického Ca^{2+} bývá signálem pro mnohé buněčné děje, včetně exocytózy neurotransmiterů z presynaptických zakončení neuronů či exocytózy hormonů z neuro- a endokrinních buněk. V srdci se Ca^{2+} ionty podílí na elektrické aktivitě srdce a jsou aktivátory myofilament. Hrají tedy důležitou roli v elektromechanickém spřažení (ECC, excitation-contraction coupling), což je proces převedení elektrické excitace na srdeční kontrakci a vyžaduje depolarizaci membrány. Jakmile je cytoplasmatická membrána depolarizována, dojde k podráždění napěťově řízených dihydropyridinových receptorů (DHPR, dihydropyridine receptors), které umožní vtok Ca^{2+} do buňky. Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytosolu vede k vylití Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula (SR) přes aktivaci ryanodinových receptorů (RyR, ryanodine receptors). Po vylití ze SR se Ca^{2+} váže na troponin c a dojde tak k vyvolání kontrakce (Bers 2002). Vápenaté ionty jsou následně vstřebávány zpět do SR přes Ca^{2+} -ATPázu sarko/endoplasmatického retikula (SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase).

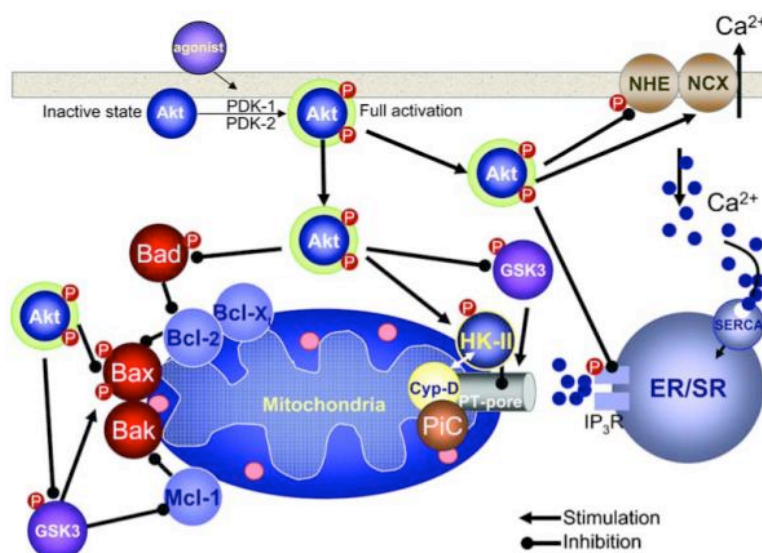
Koncentrace cytosolického Ca^{2+} je v buňce přísně regulována. Za fyziologických podmínek je koncentrace cytosolického Ca^{2+} okolo 0,1 až 0,01 $\mu\text{mol/l}$, což je o 4 až 5 řádů nižší koncentrace než v intersticiální tekutině (pro přehled S. Silbernagl: Atlas fyziologie člověka, 2004). Chybná regulace metabolismu Ca^{2+} může vést ke vzniku Ca^{2+} – indukovaného přetížení v buňce, které je následováno mitochondriální kumulací Ca^{2+} . Tato akumulace může vést až ke zvýšené produkci ROS (Starkov, Chinopoulos, a Fiskum 2004) a interakci Ca^{2+} iontů s Cyp-D, které vyvolá otevření mtPT póru vedoucí k buněčné smrti (Basso et al. 2005).

Ukazuje se, že protein kináza B/AKT je schopná zabránit Ca^{2+} – indukovanému přetížení přes regulaci Ca^{2+} kanálů. Bylo například pozorováno, že u kardiomyocytů se sníženou aktivitou PKB/AKT byla snížena i exprese $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměnného přenašeče (NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) a tedy snížené vylučování Ca^{2+} , které nakonec vedlo k apoptóze (Shigeki Miyamoto et al. 2005). U PC12 buněk bylo za hypoxických podmínek dále pozorováno, že zvýšená exprese konstitutivně aktivní PKB/AKT vedla k pozitivní regulaci exprese NCX1, což mělo za následek zlepšení transportu iontů Ca^{2+} a Na^+ (Formisano et al. 2008).

Na^+/H^+ výměnný přenašeč (NHE, Na^+/H^+ exchanger) rovněž transportuje ionty přes cytoplasmatickou membránu. V případě intracelulární acidózy, ke které dochází během ischemie, NHE transportuje H^+ ionty ven z buňky a Na^+ naopak do intracelulárního prostoru (M Avkiran a Snabaitis 1999). Zvýšená koncentrace Na^+ v buňce ovlivňuje také již výše zmíněný přenašeč NCX, který transportuje ionty Ca^{2+} a Na^+ v závislosti na jejich intracelulární koncentraci. Za fyziologických podmínek NCX transportuje Na^+ dovnitř buňky a Ca^{2+} ven, čímž udržuje nízkou intracelulární koncentraci vápenatých iontů. Nicméně za ischemických podmínek, kdy je zvýšen transport Na^+ do buňky přes NHE, může dojít k nadměrnému zvýšení koncentrace sodných iontů v buňce, což způsobí obrácený transport iontů přes NCX a Ca^{2+} se tak začne hromadit v buňce (Metin Avkiran a Marber 2002). Nedávná studie prokázala, že PKB/AKT fosforyluje NHE na Ser^{648} , a tím ho inhibuje (Snabaitis, Cuello, a Avkiran 2008). PKB/AKT by tak mohla zabránit Ca^{2+} – indukovanému přetížení v ischemickém srdci.

Rovněž bylo nedávno objeveno, že PKB/AKT fosforyluje typ-I IP_3 receptorů (IP_3R , IP_3 receptors), čímž je inhibuje a brání tak apoptóze (Szado et al. 2008). Ca^{2+} se za fyziologických podmínek vylévá z ER/SR v odpověď na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3 , inositol 1,4,5-trisphosphate) přes IP_3R , aby se mohl účastnit různých buněčných dějů (Berridge, Lipp, a Bootman 2000). Avšak za patofyziologických podmínek může vylití Ca^{2+} indukované IP_3 podnítit buněčnou smrt (Hanson, Bootman, a Roderick 2004). Například bylo zjištěno, že exprese IP_3R je výrazně zvýšena u selhávajícího srdce (Go et al. 1995), a tak regulace IP_3R protein kinázou B/AKT může hrát důležitou roli v ochraně kardiomyocytů.

Proteiny z rodiny BCL-2 se rovněž mohou podílet na homeostáze Ca^{2+} (Pinton a Rizzuto 2006), například pro-apoptotické BCL-2 proteiny BAX a BAK jsou kromě mitochondrie lokalizovány na ER, kde pravděpodobně stimulují Ca^{2+} – indukované přetížení, které následně vede k uvolnění velkého množství Ca^{2+} iontů z ER. Tyto vápenaté ionty se pak transportují do mitochondrie, což může vést ke spuštění apoptózy (Nutt et al. 2002). Nicméně údaje o potenciální roli PKB/AKT v regulaci Ca^{2+} – indukovaného přetížení přes BCL-2 proteiny nejsou známy. Bylo by rovněž zajímavé zjistit, zda se PKB/AKT podílí na regulaci Ca^{2+} – indukovaného přetížení i přes její další cílové molekuly.



Obrázek 5 PKB/AKT chrání mitochondrie proti stresu přes různé cílové molekuly (jednotlivé dráhy jsou popsány v příslušných kapitolách výše) (Shigeki Miyamoto, Murphy, a Brown 2009)

3.2 ÚLOHA PKB/AKT V OCHRANĚ KARDIOMYOCYTŮ

Je všeobecně známo, že dospělé savčí kardiomyocyty ztrácí schopnost proliferace a jejich růst je nejčastěji způsoben hypertrofií (Hinrichsen et al. 2007). K proliferaci kardiomyocytů dochází převážně během neonatálního období a po narození se kardiomyocyty dělí o poznání méně (Bergmann et al. 2009), a tak jejich buněčná smrt hraje významnou roli v srdečních chorobách včetně rozvinutí srdečního selhání (Adams et al. 2000; Gustafsson a Gottlieb 2008; Hayakawa et al. 2003).

PKB/AKT je jednou z nejlépe popsanych kináz zajišťující přežití buněk. V srdci se podílí na zachování nejen kardiomyocytů, ale také mnoha dalších buněčných typů jako jsou fibroblasty, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva cév (vascular smooth muscle cells, VSMCs) (Oudit et al. 2004).

Konstitutivně aktivní PKB/AKT se například podílí na protekci kardiomyocytů a dokonce hraje významnou úlohu v ochraně srdce vůči ischemicko-reperfúznímu poškození (Fujio et al. 2000). PKB/AKT se dále uplatňuje v ochranně kardiomyocytů před smrtí způsobenou tlakovým přetížením (pressure overload) (Ceci et al. 2007) a oxidativním stresem (Aikawa et al. 2000). Pokud je aktivita PKB/AKT snížena, jako například u městnavého srdečního selhání (CHF, congestive heart failure), dochází ke zvýšené apoptóze (Ananthakrishnan et al. 2005). Fosforylovaná PKB/AKT se rovněž výrazně uplatňuje v protektivních mechanismech ischemického “preconditioningu” (Hausenloy et al. 2005).

PKB/AKT blokuje i transkripci některých důležitých genů mající svou úlohu v indukci buněčné smrti. Fosforylací transkripčního faktoru FKHRL1, který patří do rodiny “Forkhead”, zabrání PKB/AKT jeho translokaci do jádra, kde pak nemůže podpořit transkripci genu pro Fas ligand, který se podílí na indukci apoptózy (Brunet et al. 1999).

Důležitým partnerem v kardioprotekci PKB/AKT je podle nedávných studií také kináza známá pod názvem PIM-1. PIM-1 je Ser/Thr kináza, která byla původně objevena jako onkogen negativně regulující apoptózu a zvyšující proliferaci (Z. Wang et al. 2001). PIM-1, stejně jako PKB/AKT, fosforyluje mnoho cílových molekul, které se účastní genové transkripce, regulace buněčného cyklu a také apoptózy. PIM-1 kináza například, stejně jako PKB/AKT, inaktivuje protein BAD fosforylací na Ser¹¹² (Aho et al. 2004). Aktivace PKB/AKT zvyšuje expresi PIM-1 kinázy, která se následně podílí na regulaci přežití a růstu buňky. V dospělých kardiomyocytech se exprese PIM-1 kinázy značně snižuje krátce po narození. Její exprese je znovu spuštěna při poškození srdce, například u infarktu, kdy se PIM-1 kináza shlukuje v buňkách na hranici s poškozenou oblastí. Zajímavostí je, že myši po deleci genu pro PIM-1 byly náchylnější k většímu poškození po infarktu, přestože byla zvýšena exprese i fosforylace PKB/AKT. Na základě těchto studií se zdá, že mezi PKB/AKT a PIM-1 kinázou existuje zpětnovazebná komunikace a některé mechanismy, které byly dříve přikládány pouze činnosti PKB/AKT, mohou být rovněž ovlivňovány PIM-1 kinázou. Není vyloučena ani přímá funkce PIM-1 kinázy nezávislá na PKB/AKT (Muraski et al. 2007; Shigeki Miyamoto, Rubio, a Sussman 2009; Borillo et al. 2010).

3.3 ÚLOHA PKB/AKT V PROLIFERACI KARDIOMYOCYTŮ

Jak už jsem se zmínila v předchozích odstavcích, proliferace kardiomyocytů značně klesá po narození a následně probíhá většinou na velice nízké úrovni. PI3K/AKT signalizační dráha hraje důležitou roli v dělení nejen kardiomyocytů, ale také v proliferaci srdečních progenitorových buněk (CPCs, cardiac progenitor cells) (Gude et al. 2006), které jsou známé svým vysokým diferenciačním potenciálem (Gaetani et al. 2012).

Některé signální molekuly působící na buněčné receptory, jako jsou například IGF-1 a estrogen, způsobují kumulaci PKB/AKT v buněčném jádře, která se projevuje na jedné straně kardioprotektivními účinky, ale také má vliv na proliferaci srdečních svalových buněk. To potvrdily analýzy srdcí transgenních myší, které po zacílení exprese PKB/AKT do buněčného jádra ukázaly nárůst počtu kardiomyocytů (M. Sussman 2007). PKB/AKT působí i na aktivitu telomerázy, která má vliv na proliferaci buněk a brání apoptóze (Torella et al. 2004).

IGF-1 také zvyšuje kinázovou aktivitu cyklinu D/E/A a vyvolává tak DNA syntézu, pravděpodobně též přes protein kinázu B/AKT (Reiss et al. 1994). PKB/AKT navíc fosforyluje GSK-3 β , která reguluje cyklin D1, který je po fosforylaci kinázou GSK-3 β přeměrován do cytosolu a degradován proteasomem. Cyclin D1 se podílí na regulaci buněčného cyklu a jeho degradace má vliv na zvýšení účinku inhibitorů buněčného cyklu (např. p27). Fosforylace GSK-3 β protein kinázou B/AKT vede k její inhibici, a tak PKB/AKT předchází degradaci cyklinu D1 (Hinrichsen et al. 2007; Rimerman, Gellert-Randleman, a Diehl 2000).

Skupina okolo Rebeccy Hinrichsenové rovněž zjistila, že růstový faktor PDGF navozuje proliferaci v kulturách neonatálních srdečních buněk a potvrdili, že takto indukovaná proliferace souvisí s aktivací PKB/AKT, inaktivací GSK-3 β a se snížením účinku p27, inhibitoru cyklin-dependentní kinázy (Hinrichsen et al. 2007).

PKB/AKT dále reguluje proliferaci přes fosforylaci “Forkhead O” transkripčních faktorů (FOXO). FOXO1 a FOXO3 negativně regulují proliferaci srdečních buněk během embryonálního i neonatálního vývoje. Protein kináza B/AKT se podílí na kontrole těchto proteinů, fosforyluje je a tím je inaktivuje (Evans-Anderson, Alfieri, a Yutzey 2008).

Na základě těchto studií lze říci, že PKB/AKT sehrává významnou roli v proliferaci kardiomyocytů, nicméně je nutné více prozkoumat jednotlivé kroky tohoto procesu.

3.4 ÚLOHA PKB/AKT V REGULACI METABOLISMU

Aby srdce pokrylo své vysoké energetické nároky, využívá mnoho substrátů pro syntézu ATP, jako jsou například mastné kyseliny, laktát, aminokyseliny a glukóza (Lopaschuk et al. 2010). Změny v poměrech využitých energetických substrátů vedou k narušení metabolismu srdce, což následně může směřovat například k obezitě a dalším metabolickým poruchám (Buchanan et al. 2005).

Snížená spotřeba glukózy a zvýšená oxidace mastných kyselin jsou známkami experimentálně přivoleného diabetu a má to pravděpodobně za následek rozvoj diabetické kardiomyopatie, což dále vede k zhoršené kontraktilitě a zvýšené citlivosti srdce vůči ischemicko-reperfúznímu poškození (P. Wang et al. 2005). Oxidace glukózy tedy hraje v energetickém metabolismu myokardu značnou roli i přesto, že není hlavním energetickým substrátem srdce.

S ohledem na důležitost glukózy v srdci, je výzkum jejího transportu velice významný a zaslouží si pozornost vědecké společnosti. V kardiomyocytech je glukóza transportována

přes glukózové transportéry 1 a 4 (GLUT1 a GLUT4), které jsou lokalizovány na sarkolemně a membráně buněčných kompartmentů. GLUT1 má hlavně na starost udržení homeostázy metabolismu glukózy za fyziologických podmínek. Zatímco GLUT4 se translokuje do plasmatické membrány i za patofyziologických podmínek a zvyšuje tak příjem glukózy do buněk (Kraegen et al. 1993).

PKB/AKT je přímo schopná stimulovat vstřebávání glukózy v odpověď na insulin, kdy kupříkladu PKB β /AKT2 v adipocytech asociuje s váčky obsahující GLUT4, a tak se zřejmě podílí na distribuci GLUT4 v buňce (Calera et al. 1998).

PKB/AKT také podporuje translokaci GLUT4 do sarkolemy přes fosforylaci a inaktivaci AKT substrátu 160 (AS160, AKT substrate of 160kDa). AS160 je protein aktivující RAB GTPázu a má 6 PKB/AKT fosforylačních míst, přičemž 5 z nich je fosforylováno v odpověď na insulin (Sano et al. 2003). Změna těchto fosforylačních míst vede k inhibici translokace GLUT4 do plasmatické membrány a tak vstřebávání glukózy (Kramer et al. 2006).

Translokace GLUT4 je zvláště důležitá za patofyziologických podmínek. Jeho aktivace patří k nejdůležitějším mechanismům, přes které srdeční buňky zvýší vstřebávání glukózy během ischemie (D. Sun et al. 1994). Akutní ischemie myokardu je většinou doprovázena zvýšenou spotřebou a zrychleným metabolismem glukózy a tento proces se zdá být důležitý pro ochranu buněk před ischemickým poškozením. Bylo zjištěno, že ischemie vyvolává značnou translokaci GLUT4 do plasmatické membrány kardiomyocytů a právě tento děj má za následek zvýšený transport glukózy do buněk (D. Sun et al. 1994). Dále bylo prokázáno, že nedostatek GLUT4 v myokardu vede po globální ischemii s následnou reperfúzí k vážné systolické a diastolické dysfunkci (Tian a Abel 2001).

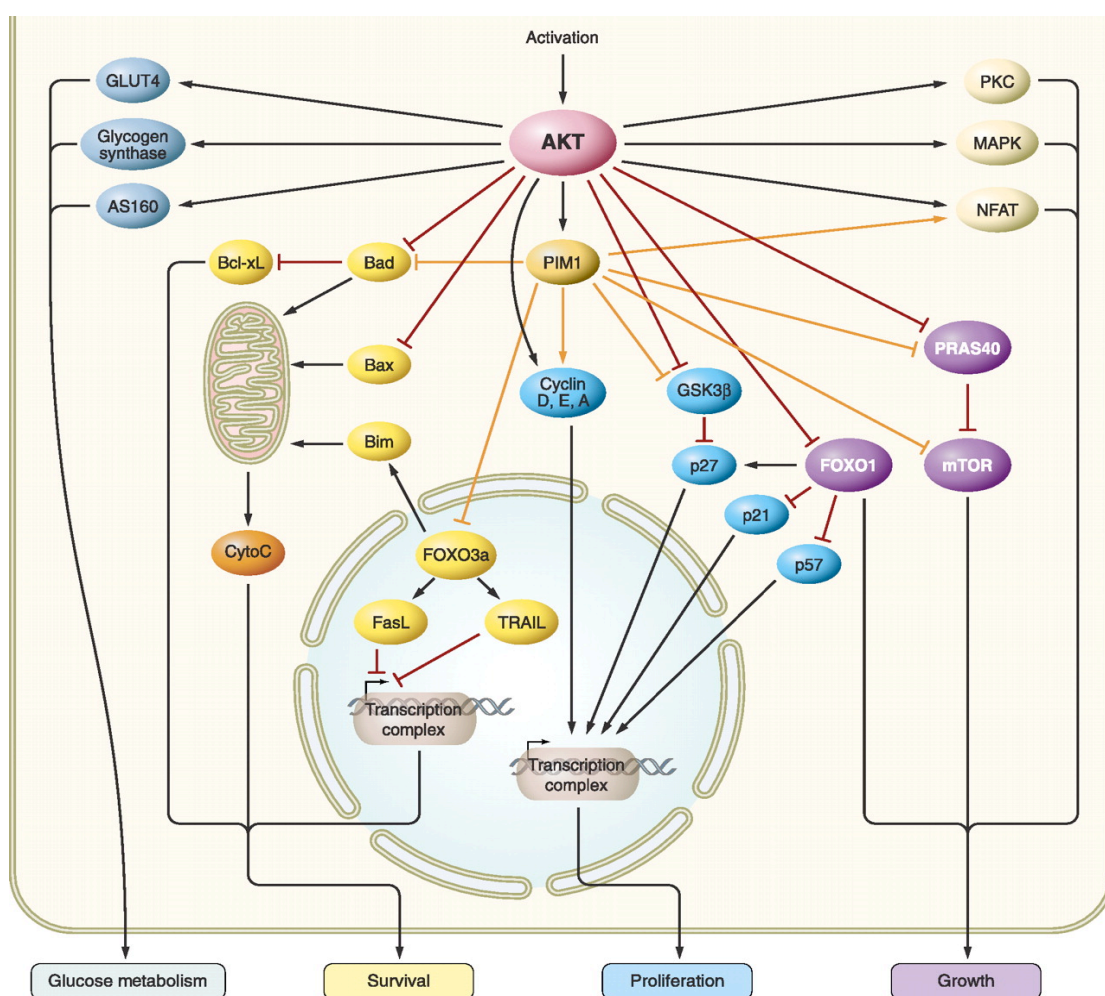
PKB/AKT reguluje buněčný metabolismus přes několik dalších cílových molekul, jako jsou transkripční faktory FOXO (pro přehled (D. N. Gross, van den Heuvel, a Birnbaum 2008; Engelman, Luo, a Cantley 2006)), ale také dráha mTOR (viz dále).

PKB/AKT například stimuluje produkci hypoxií indukovaného faktoru α (HIF α , hypoxia-inducible factor) částečně přes mTORC1, přes který dochází k syntéze HIF-1 α i HIF-2 α (Semenza 2003), a také přes mTORC2, který podněcuje syntézu HIF-2 α (Toschi et al. 2008). HIF reguluje transkripci mnoha genů, které kódují proteiny podílející se na velkém množství buněčných funkcí včetně glukózového metabolismu. Například HIF-1 pozitivně reguluje i transkripci HK-II v odpověď na hypoxické podmínky (Riddle et al. 2000).

Závěrem je třeba říci, že se objevuje stále více důkazů o tom, že signální dráhy chránící buňky před smrtí a dráhy řídící energetický metabolismus jsou úzce propojené.

Insulin, hormon regulující hladinu cukru v krvi, jak již bylo řečeno, patří mezi signální molekuly aktivující signální dráhu PI3K/AKT a prokazuje se kardioprotektivními účinky (Xing et al. 2009). V případě srdeční ischemie a následné reperfúze insulin aktivuje PKB/AKT, která fosforyluje endoteliální NO syntázu (eNOS, endothelial nitric oxide synthase). Endoteliální NOS začne produkovat oxid dusnatý (NO), který se následně podílí na ochraně buněk (Gao et al. 2002) tak, že potlačuje mimo jiné štěpení anti-apoptotického proteinu BCL-2 kaspázami-3 a tím brání vylití cytochromu c z mitochondrie (Kim et al. 1998), dále brání buňku stimulací cytoprotektivních proteinů a potlačuje aktivitu pro-apoptotických kaspáz (pro přehled (Kim, Bombeck, a Billiar 1999)).

Tato data jen dokazují provázanost protektivních a metabolických signálních drah PKB/AKT. Signální dráha PI3K/AKT je tak jednou z klíčových drah regulujících jak přežití buňky, tak její metabolismus (Matsui a Rosenzweig 2005).



Obrázek 6: Signalizace PKB/AKT Toto schéma shrnuje buněčné procesy v myokardu, které může protein kináza B/AKT ovlivňovat a ukazuje některé z důležitých substrátů, jejichž prostřednictvím tato regulace probíhá. PKB/AKT se podílí na regulaci růstu buněk, translaci proteinů, metabolismu a přežití buněk. (M. A. Sussman et al. 2011)

4. ZÁVĚR

Na kardiovaskulární choroby umírá každým rokem čím dál více lidí. Z tohoto důvodu je pozornost vědecké společnosti upnuta na mechanismy, které by mohly ochránit srdce a srdeční buňky před poškozením. Kardiovaskulární výzkum nashromáždil v posledních letech mnoho poznatků objasňující roli PKB/AKT v kardiomyocytech. Bylo například zjištěno, že PKB/AKT chrání kardiomyocyty před buněčnou smrtí způsobenou ischemicko-reperfúzním poškozením, hypoglykemií či působením toxických látek. Na základě těchto nálezů se PKB/AKT stala centrem pozornosti celosvětového výzkumu a v budoucnosti by mohla být jedním z terapeutických cílů v léčbě ischemicko-reperfúzního poškození myokardu.

V dnešní době jsou známy 3 isoformy PKB/AKT, přičemž všechny se pravděpodobně podílejí na ochraně kardiomyocytů a zastávají další důležité funkce v myokardu. Zajímavá je zvláště isoforma PKB β /AKT2, která se po své aktivaci akumuluje v blízkosti mitochondrií a je v srdci spojována s přežitím kardiomyocytů v případě ischemického poškození. Zároveň se tato isoforma podílí na udržení homeostázy metabolismu glukózy. PKB α /AKT1 je rovněž spojována s kardioprotektivními účinky, ale také zastává důležitou roli v proliferaci. Isoforma PKB γ /AKT3 je nejvíce spojována s růstem srdce. V dostupné literatuře nejsou isoformy v signálních drahách příliš rozlišovány, a tak v budoucích letech by se výzkum měl zaměřit i na rozpoznání signálních drah jednotlivých isoform a popřípadě na možnost přímého ovlivnění této signalizace.

Signální dráhy PKB/AKT se vyznačují obrovskou komplexitou a mnohostranným charakterem, kdy PKB/AKT reguluje řadu cílových molekul, které se podílejí na regulaci buněčných procesů v rozmanitých signálních drahách. Tyto buněčné procesy jsou navíc mezi sebou úzce propojeny, a proto není divu, že se mechanismy zodpovědné za ochranu buněk vůči apoptóze mohou také podílet na regulaci energetického metabolismu či udržování homeostázy iontů v buňce. PKB/AKT tak může zajišťovat integritu mitochondriálních membrán a kontrolovat apoptózu přes několik signálních drah najednou.

Jelikož mitochondrie odpovídají za energetickou spotřebu buňky, jsou snadným cílem apoptotických dějů. V případě, kdy dojde k příliš velkému poškození buňky (například poškození DNA), buňka vyšle signál ke spuštění apoptotické dráhy, která má za následek narušení integrity mitochondriálních membrán. Jakmile je integrita vnější membrány mitochondrie narušena, dojde k výlevu aktivátorů apoptotické dráhy, mezi které patří například i cytochrom c. Výlev těchto aktivátorů je doposud předmětem mnoha výzkumů.

Jednou z možností je výlev přes mtPT póru, jehož struktura není přesně známa. V literatuře můžeme o tomto póru nalézt sporné informace a je tedy zapotřebí dalšího výzkumu pro objasnění mechanismů podílejících se na jeho otevření.

PKB/AKT se podílí na regulaci různých proteinů mající roli v apoptotické dráze, a tak chrání buňku před buněčnou smrtí. PKB/AKT fosforyluje a ovlivňuje transkripci některých proteinů z rodiny BCL-2 (BAX, BAK, BAD, BCL-xL), rovněž fosforyluje a tím inhibuje GSK-3 β , čímž také reguluje vylití cytochromu c z mitochondrie.

Nedávné studie také prokázaly, že PKB/AKT ovlivňuje vazbu HK-II na vnější mitochondriální membránu. Takto navázaná HK-II upřednostňuje dráhu glykolýzy před syntézou glykogenu, jako je tomu u cytosolické formy HK-II. To je v souladu se současnou fosforylací GSK-3 β pomocí PKB/AKT a následnou inhibicí glykogen syntázy. Asociace HK-II s mitochondrií také brání zpětné inhibici jejím produktem glukóza-6-fosfátem. Zároveň je tak glykolýza přímo spřažena s oxidativní fosforylací a HK-II tak zvýšenou dodávkou ADP pro ATP syntázu podporuje dýchání mitochondrií. Kromě stimulace oxidativní fosforylace reguluje mitochondriální HK-II otevření mtPT póru a zamezuje tak spuštění apoptózy. Navíc svojí vazbou brání translokaci pro-apoptotického proteinu BAX do vnější mitochondriální membrány, čímž opět pomáhá inhibovat apoptózu. Nedávno byl tento kardioprotektivní mechanismus potvrzen jak na srdečních embryonálních buňkách (S Miyamoto, Murphy, a Brown 2007), tak také na perfundovaném srdci (Zuurbier, Eerbeek, a Meijer 2005), nicméně kardioprotektivní úloha HK-II stále ještě nebyla potvrzena *in vivo*.

PKB/AKT hraje, jak již bylo řečeno, důležitou roli nejen v metabolismu, kdy mimo jiné stimuluje vstřebávání glukózy přes glukózové transportéry, ale také v proliferaci, například přes inaktivaci GSK-3 β a transkripčních faktorů FOXO, a v buněčném růstu.

Všechny výše zmíněné poznatky poukazují na nesmírnou složitost signalizace PKB/AKT a na vzájemnou souhru všech dějů v buňce. Vzhledem k tomu, že většina nálezů pochází z *in vitro* experimentů, měl by se další výzkum soustředit hlavně na ověření známých faktů *in vivo*, což by následně mohlo vést i k možnému terapeutickému využití protein kinázy B/AKT v léčbě srdečních chorob.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, J W, A L Pagel, C K Means, D Oksenberg, R C Armstrong, a J H Brown. 2000. „Cardiomyocyte apoptosis induced by Galphaq signaling is mediated by permeability transition pore formation and activation of the mitochondrial death pathway“. *Circulation research* 87 (12) (prosinec 8): 1180–1187.
- Ahmad, Aftab, Shama Ahmad, B Kelly Schneider, Corrie B Allen, Ling-Yi Chang, a Carl W White. 2002. „Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury“. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283 (3) (září): L573–584. doi:10.1152/ajplung.00410.2001.
- Aho, Teija L.T, Jouko Sandholm, Katriina J Peltola, Harri P Mankonen, Michael Lilly, a Päivi J Koskinen. 2004. „Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site“. *FEBS Letters* 571 (1–3): 43–49. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.050.
- Aikawa, Ryuichi, Masao Nawano, Yaping Gu, Hideki Katagiri, Tomoichiro Asano, Weidong Zhu, Ryozi Nagai, a Issei Komuro. 2000. „Insulin Prevents Cardiomyocytes From Oxidative Stress–Induced Apoptosis Through Activation of PI3 Kinase/Akt“. *Circulation* 102 (23) (květen 12): 2873–2879. doi:10.1161/01.CIR.102.23.2873.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, a B. A. Hemmings. 1996. „Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.“ *The EMBO Journal* 15 (23) (prosinec 2): 6541.
- Altomare, D A, G E Lyons, Y Mitsuuchi, J Q Cheng, a J R Testa. 1998. „Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin“. *Oncogene* 16 (18) (květen 7): 2407–2411. doi:10.1038/sj.onc.1201750.
- Ananthakrishnan, Radha, Gordon W Moe, Michael J Goldenthal, a José Marín-García. 2005. „Akt signaling pathway in pacing-induced heart failure“. *Molecular and cellular biochemistry* 268 (1-2) (leden): 103–110.
- Andrienko, T., A. V. Kuznetsov, T. Kaambre, Y. Usson, A. Orosco, F. Appaix, T. Tiivel, et al. 2003. „Metabolic Consequences of Functional Complexes of Mitochondria, Myofibrils and Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Cells“. *Journal of Experimental Biology* 206 (12) (červen 15): 2059–2072. doi:10.1242/jeb.00242.
- Armstrong, Stephen C. 2004. „Protein Kinase Activation and Myocardial Ischemia/reperfusion Injury“. *Cardiovascular Research* 61 (3) (únor 15): 427–436. doi:10.1016/j.cardiores.2003.09.031.
- Avkiran, M, a A K Snabaitis. 1999. „Regulation of cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity: potential pathophysiological significance of endogenous mediators and oxidant stress“. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 8 (1) (červenec): 25–32.
- Avkiran, Metin, a Michael S Marber. 2002. „Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects“. *Journal of the American College of Cardiology* 39 (5) (březen 6): 747–753.
- Azoulay-Zohar, Heftsi, Adrian Israelson, Salah Abu-Hamad, a Varda Shoshan-Barmatz. 2004. „In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death“. *Biochemical Journal* 377 (2) (leden 15): 347. doi:10.1042/BJ20031465.
- Badorff, Cornel, Florian H. Seeger, Andreas M. Zeiher, a Stefanie Dimmeler. 2005. „Glycogen Synthase Kinase 3 β Inhibits Myocardin-Dependent Transcription and Hypertrophy Induction Through Site-Specific Phosphorylation“. *Circulation Research* 97 (7) (září 30): 645–654. doi:10.1161/01.RES.0000184684.88750.FE.
- Baines, Christopher P., Robert A. Kaiser, Tatiana Sheiko, William J. Craigen, a Jeffery D. Molkentin. 2007. „Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death“. *Nature Cell Biology* 9 (5) (duben 8): 550–555. doi:10.1038/ncb1575.
- Basso, Emy, Lisa Fante, Jonathan Fowlkes, Valeria Petronilli, Michael A. Forte, a Paolo Bernardi. 2005. „Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D“. *Journal of Biological Chemistry* 280 (19) (květen 13): 18558–18561. doi:10.1074/jbc.C500089200.

- Beals, C. R., N. A. Clipstone, S. N. Ho, a G. R. Crabtree. 1997. „Nuclear Localization of NF-ATc by a Calcineurin-dependent, Cyclosporin-sensitive Intramolecular Interaction.“ *Genes & Development* 11 (7) (leden 4): 824–834. doi:10.1101/gad.11.7.824.
- Bellacosa, A., Jr Testa, Sp Staal, a Pn Tsichlis. 1991. „A Retroviral Oncogene, Akt, Encoding a Serine-Threonine Kinase Containing an Sh2-Like Region“. *Science* 254 (5029) (říjen 11): 274–277. doi:10.1126/science.1833819.
- Bergmann, Olaf, Ratan D. Bhardwaj, Samuel Bernard, Sofia Zdunek, Fanie Barnabé-Heider, Stuart Walsh, Joel Zupicich, et al. 2009. „Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans“. *Science* 324 (5923) (březen 4): 98–102. doi:10.1126/science.1164680.
- Berridge, M J, P Lipp, a M D Bootman. 2000. „The versatility and universality of calcium signalling“. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1 (1) (říjen): 11–21. doi:10.1038/35036035.
- Bers, Donald M. 2002. „Cardiac Excitation–contraction Coupling“. *Nature* 415 (6868) (leden 10): 198–205. doi:10.1038/415198a.
- Bishopric, Nanette H, Peter Andreka, Tatiana Slepak, a Keith A Webster. 2001. „Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte“. *Current Opinion in Pharmacology* 1 (2) (duben 1): 141–150. doi:10.1016/S1471-4892(01)00032-7.
- Borillo, Gwynngelle A., Matt Mason, Pearl Quijada, Mirko Völkers, Christopher Cottage, Michael McGregor, Shabana Din, et al. 2010. „Pim-1 Kinase Protects Mitochondrial Integrity in Cardiomyocytes“. *Circulation Research* 106 (7) (duben 16): 1265 –1274. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.212035.
- Brar, B K, A Stephanou, D Pennica, a D S Latchman. 2001. „CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways“. *Cytokine* 16 (3) (listopad 7): 93–96. doi:10.1006/cyto.2001.0951.
- Brodbeck, Daniela, Peter Cron, a Brian A. Hemmings. 1999. „A Human Protein Kinase By with Regulatory Phosphorylation Sites in the Activation Loop and in the C-terminal Hydrophobic Domain“. *Journal of Biological Chemistry* 274 (14) (únor 4): 9133–9136. doi:10.1074/jbc.274.14.9133.
- Brunet, Anne, Azad Bonni, Michael J Zigmond, Michael Z Lin, Peter Juo, Linda S Hu, Michael J Anderson, Karen C Arden, John Blenis, a Michael E Greenberg. 1999. „Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor“. *Cell* 96 (6) (březen 19): 857–868. doi:10.1016/S0092-8674(00)80595-4.
- Buchanan, Jonathan, Pradip K. Mazumder, Ping Hu, Gopa Chakrabarti, Matthew W. Roberts, Ui Jeong Yun, Robert C. Cooksey, Sheldon E. Litwin, a E. Dale Abel. 2005. „Reduced Cardiac Efficiency and Altered Substrate Metabolism Precedes the Onset of Hyperglycemia and Contractile Dysfunction in Two Mouse Models of Insulin Resistance and Obesity“. *Endocrinology* 146 (12) (leden 12): 5341–5349. doi:10.1210/en.2005-0938.
- Calera, M R, C Martinez, H Liu, A K Jack, M J Birnbaum, a P F Pilch. 1998. „Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles“. *The Journal of biological chemistry* 273 (13) (březen 27): 7201–7204.
- Calvert, John W, Marah E Condit, Juan Pablo Aragón, Chad K Nicholson, Bridgette F Moody, Rebecca L Hood, Amy L Sindler, et al. 2011. „Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of $\beta(3)$ -adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols“. *Circulation research* 108 (12) (červen 10): 1448–1458. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.241117.
- Ceci, M, P Gallo, M Santonastasi, S Grimaldi, M V G Latronico, A Pitisci, E Missol-Kolka, et al. 2007. „Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis“. *Cell Death Differ* 14 (5) (leden 19): 1060–1062.
- Coffer, Paul J., a James R. Woodgett. 1991. „Molecular Cloning and Characterisation of a Novel Putative Protein-serine Kinase Related to the cAMP-dependent and Protein Kinase C Families“. *European Journal of Biochemistry* 201 (2): 475–481. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16305.x.
- Craig, R, M Wagner, T McCardle, A G Craig, a C C Glembotski. 2001. „The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-

- kappa B". *The Journal of biological chemistry* 276 (40) (říjen 5): 37621–37629. doi:10.1074/jbc.M103276200.
- Cross, D A, D R Alessi, P Cohen, M Andjelkovich, a B A Hemmings. 1995. „Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B". *Nature* 378 (6559) (prosinec 21): 785–789. doi:10.1038/378785a0.
- Datta, Sandeep Robert, Henryk Dudek, Xu Tao, Shane Masters, Haian Fu, Yukiko Gotoh, a Michael E Greenberg. 1997. „Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery". *Cell* 91 (2): 231–241. doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5.
- DeBosch, Brian, Nandakumar Sambandam, Carla Weinheimer, Michael Courtois, a Anthony J. Muslin. 2006. „Akt2 Regulates Cardiac Metabolism and Cardiomyocyte Survival". *Journal of Biological Chemistry* 281 (43) (říjen 27): 32841–32851. doi:10.1074/jbc.M513087200.
- DeBosch, Brian, Iya Treskov, Traian S. Lupu, Carla Weinheimer, Attila Kovacs, Michael Courtois, a Anthony J. Muslin. 2006. „Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth". *Circulation* 113 (17) (únor 5): 2097–2104. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595231.
- Ding, Yun-Hong, Xia-Dong Luan, Jie Li, José A Rafols, M Guthinkonda, Fernando G Diaz, a Yuchuan Ding. 2004. „Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke". *Current neurovascular research* 1 (5) (prosinec): 411–420.
- Doble, Bradley W., a James R. Woodgett. 2003. „GSK-3: Tricks of the Trade for a Multi-tasking Kinase". *Journal of Cell Science* 116 (7) (leden 4): 1175–1186. doi:10.1242/jcs.00384.
- Dyall, Sabrina D., Mark T. Brown, a Patricia J. Johnson. 2004. „Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles". *Science* 304 (5668) (září 4): 253–257. doi:10.1126/science.1094884.
- Eliseev, R. A., J. Malecki, T. Lester, Y. Zhang, J. Humphrey, a T. E. Gunter. 2009. „Cyclophilin D Interacts with Bcl2 and Exerts an Anti-apoptotic Effect". *Journal of Biological Chemistry* 284 (15) (únor 13): 9692–9699. doi:10.1074/jbc.M808750200.
- Embi, N, D B Rylatt, a P Cohen. 1980. „Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase". *European journal of biochemistry / FEBS* 107 (2) (červen): 519–527.
- Engelman, Jeffrey A, Ji Luo, a Lewis C Cantley. 2006. „The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism". *Nature reviews. Genetics* 7 (8) (srpen): 606–619. doi:10.1038/nrg1879.
- Evans-Anderson, Heather J., Christina M. Alfieri, a Katherine E. Yutzey. 2008. „Regulation of Cardiomyocyte Proliferation and Myocardial Growth During Development by FOXO Transcription Factors". *Circulation Research* 102 (6) (březen 28): 686–694. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.163428.
- Formisano, Luigi, Mariangela Saggese, Agnese Secondo, Rossana Sirabella, Pasquale Vito, Valeria Valsecchi, Pasquale Molinaro, Gianfranco Di Renzo, a Lucio Annunziato. 2008. „The Two Isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger, NCX1 and NCX3, Constitute Novel Additional Targets for the Prosurvival Action of Akt/Protein Kinase B Pathway". *Molecular Pharmacology* 73 (3) (leden 3): 727–737. doi:10.1124/mol.107.042549.
- Franke, T. F. 2008. „PI3K/Akt: getting it right matters". *Oncogene* 27 (50) (říjen 27): 6473–6488. doi:10.1038/onc.2008.313.
- Fueger, Patrick T. 2005. „GLUCOSE PHOSPHORYLATION AS A BARRIER TO MUSCLE GLUCOSE UPTAKE". *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32 (4): 314–318. doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04190.x.
- Fujio, Yasushi, Thao Nguyen, Detlef Wencker, Richard N. Kitsis, a Kenneth Walsh. 2000. „Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart". *Circulation* 101 (6): 660–667. doi:10.1161/01.CIR.101.6.660.
- Gaetani, Roberto, Peter A. Doevendans, Corina H.G. Metz, Jacqueline Alblas, Elisa Messina, Alessandro Giacomello, a Joost P.G. Sluijter. 2012. „Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells". *Biomaterials* 33 (6): 1782–1790. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.003.
- Gao, Feng, Erhe Gao, Tian-Li Yue, Eliot H. Ohlstein, Bernard L. Lopez, Theodore A. Christopher, a Xin-Liang Ma. 2002. „Nitric Oxide Mediates the Antiapoptotic Effect of Insulin in

- Myocardial Ischemia-Reperfusion The Roles of PI3-Kinase, Akt, and Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation". *Circulation* 105 (12) (březen 26): 1497–1502. doi:10.1161/01.CIR.0000012529.00367.0F.
- Go, L O, M C Moschella, J Watras, K K Handa, B S Fyfe, a A R Marks. 1995. „Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure". *The Journal of clinical investigation* 95 (2) (únor): 888–894. doi:10.1172/JCI117739.
- Gomez, Ludovic, Mélanie Paillard, Hélène Thibault, Geneviève Derumeaux, a Michel Ovize. 2008. „Inhibition of GSK3 β by Postconditioning Is Required to Prevent Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore During Reperfusion". *Circulation* 117 (21) (květen 27): 2761–2768. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755066.
- Gorman, Adrienne M., Sandra J.M. Healy, Richard Jäger, a Afshin Samali. 2012. „Stress management at the ER: Regulators of ER stress-induced apoptosis". *Pharmacology & Therapeutics* 134 (3): 306–316. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.02.003.
- Gross, Atan, Jennifer Jockel, Michael C. Wei, a Stanley J. Korsmeyer. 1998. „Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis". *The EMBO Journal* 17 (14) (červenec 15): 3878–3885. doi:10.1093/emboj/17.14.3878.
- Gross, D N, A P J van den Heuvel, a M J Birnbaum. 2008. „The role of FoxO in the regulation of metabolism". *Oncogene* 27 (16) (duben 7): 2320–2336. doi:10.1038/onc.2008.25.
- Gude, Natalie, John Muraski, Marta Rubio, Jan Kajstura, Erik Schaefer, Piero Anversa, a Mark A. Sussman. 2006. „Akt Promotes Increased Cardiomyocyte Cycling and Expansion of the Cardiac Progenitor Cell Population". *Circulation Research* 99 (4) (srpen 18): 381–388. doi:10.1161/01.RES.0000236754.21499.1c.
- Gustafsson, Asa B, a Roberta A Gottlieb. 2008. „Heart mitochondria: gates of life and death". *Cardiovascular research* 77 (2) (leden 15): 334–343. doi:10.1093/cvr/cvm005.
- Hanson, C Jane, Martin D Bootman, a H Llewelyn Roderick. 2004. „Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death". *Current biology: CB* 14 (21) (listopad 9): R933–935. doi:10.1016/j.cub.2004.10.019.
- Haq, Syed, Ashour Michael, Michele Andreucci, Kausik Bhattacharya, Paolo Dotto, Brian Walters, James Woodgett, Heiko Kilter, a Thomas Force. 2003. „Stabilization of B-catenin by a Wnt-independent Mechanism Regulates Cardiomyocyte Growth". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8) (duben 15): 4610–4615. doi:10.1073/pnas.0835895100.
- Hausenloy, Derek J, A Tsang, Mihaela M Mocanu, a Derek M Yellon. 2005. „Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion". *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (2) (únor): H971–976. doi:10.1152/ajpheart.00374.2004.
- Hayakawa, Yukihiro, Madhulika Chandra, Wenfeng Miao, Jamshid Shirani, Joan Heller Brown, Gerald W Dorn 2nd, Robert C Armstrong, a Richard N Kitsis. 2003. „Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice". *Circulation* 108 (24) (prosinec 16): 3036–3041. doi:10.1161/01.CIR.0000101920.72665.58.
- Heineke, Joerg, Kai C Wollert, Hanna Osinska, Michelle A Sargent, Allen J York, Jeffrey Robbins, a Jeffery D Molkentin. 2010. „Calcineurin protects the heart in a murine model of dilated cardiomyopathy". *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (6) (červen): 1080–1087. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.10.012.
- Hinrichsen, Rebecca, Stig HaunsØ, Rebecca Hinrichsen, Stig HaunsØ, Peter K. Busk, Rebecca Hinrichsen, Stig HaunsØ, a Peter K. Busk. 2007. „Different regulation of p27 and Akt during cardiomyocyte proliferation and hypertrophy". *Growth Factors* 25 (2) (leden): 132–140. doi:10.1080/08977190701549835.
- Hirota, Shinichi, Peiyong Zhai, Hideharu Tomita, Jonathan Galeotti, Juan Pablo Marquez, Shumin Gao, Chull Hong, Atsuko Yatani, Jesús Avila, a Junichi Sadoshima. 2007. „Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 β During Heart Failure Is Protective". *Circulation Research* 101 (11) (listopad 26): 1164–1174. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160614.
- Hsieh, Patrick C H, Michael E Davis, Joseph Gannon, Catherine MacGillivray, a Richard T Lee. 2006. „Controlled delivery of PDGF-BB for myocardial protection using injectable self-assembling

- peptide nanofibers“. *The Journal of clinical investigation* 116 (1) (leden): 237–248. doi:10.1172/JCI25878.
- Hurtado, A. 1960. „Some clinical aspects of life at high altitudes“. *Annals of internal medicine* 53 (srpen): 247–258.
- Chang, Zai, Qin Zhang, Qiuting Feng, Jie Xu, Teng Teng, Qing Luan, Congjia Shan, et al. 2010. „Deletion of Akt1 causes heart defects and abnormal cardiomyocyte proliferation“. *Developmental Biology* 347 (2) (listopad 15): 384–391. doi:10.1016/j.ydbio.2010.08.033.
- Chen, Min, Dong-Jun Won, Stan Krajewski, a Roberta A. Gottlieb. 2002. „Calpain and Mitochondria in Ischemia/Reperfusion Injury“. *Journal of Biological Chemistry* 277 (32) (září 8): 29181–29186. doi:10.1074/jbc.M204951200.
- Chesley, Alan, Martha S. Lundberg, Toshinobu Asai, Rui-Ping Xiao, Seiji Ohtani, Edward G. Lakatta, a Michael T. Crow. 2000. „The β_2 -Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes Through Gi-Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase“. *Circulation Research* 87 (12) (srpen 12): 1172–1179. doi:10.1161/01.RES.87.12.1172.
- Chiara, Federica, Diego Castellaro, Oriano Marin, Valeria Petronilli, William S. Brusilow, Magdalena Juhaszova, Steven J. Sollott, Michael Forte, Paolo Bernardi, a Andrea Rasola. 2008. „Hexokinase II Detachment from Mitochondria Triggers Apoptosis through the Permeability Transition Pore Independent of Voltage-Dependent Anion Channels“. Ed. Karl-Wilhelm Koch. *PLoS ONE* 3 (3) (březen 19): e1852. doi:10.1371/journal.pone.0001852.
- Cho, Han, James Mu, Jason K. Kim, Joanne L. Thorvaldsen, Qingwei Chu, E. Bryan Crenshaw, Klaus H. Kaestner, Marisa S. Bartolomei, Gerald I. Shulman, a Morris J. Birnbaum. 2001. „Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β)“. *Science* 292 (5522) (leden 6): 1728–1731. doi:10.1126/science.292.5522.1728.
- Cho, Han, Joanne L. Thorvaldsen, Qingwei Chu, Fei Feng, a Morris J. Birnbaum. 2001. „Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice“. *Journal of Biological Chemistry* 276 (42) (říjen 19): 38349–38352. doi:10.1074/jbc.C100462200.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz, F. J. Pitossi, F. Maurer, a B. A. Hemmings. 1991. „Molecular Cloning and Identification of a Serine/Threonine Protein Kinase of the Second-Messenger Subfamily“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (10) (květen 15): 4171–4175.
- Julian, Downward. 2004. „PI 3-kinase, Akt and cell survival“. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15 (2) (duben): 177–182. doi:10.1016/j.semcdb.2004.01.002.
- Kavazis, Andreas N, Sophie Alvarez, Erin Talbert, Youngil Lee, a Scott K Powers. 2009. „Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins“. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 297 (1) (červenec): H144–152. doi:10.1152/ajpheart.01278.2008.
- Kim, Young-Myeong, Christopher A. Bombeck, a Timothy R. Billiar. 1999. „Nitric Oxide as a Bifunctional Regulator of Apoptosis“. *Circulation Research* 84 (3) (únor 19): 253–256. doi:10.1161/01.RES.84.3.253.
- Kim, Young-Myeong, Tae-Hyoung Kim, Dai-Wu Seol, Robert V. Talanian, a Timothy R. Billiar. 1998. „Nitric Oxide Suppression of Apoptosis Occurs in Association with an Inhibition of Bcl-2 Cleavage and Cytochrome cRelease“. *Journal of Biological Chemistry* 273 (47) (listopad 20): 31437–31441. doi:10.1074/jbc.273.47.31437.
- Kokoszka, Jason E., Katrina G. Waymire, Shawn E. Levy, James E. Sligh, Jiyang Cai, Dean P. Jones, Grant R. MacGregor, a Douglas C. Wallace. 2004. „The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore“. *Nature* 427 (6973) (leden 29): 461–465. doi:10.1038/nature02229.
- Korytowski, W., L. V. Basova, A. Pilat, R. M. Kernstock, a A. W. Girotti. 2011. „Permeabilization of the Mitochondrial Outer Membrane by Bax/Truncated Bid (tBid) Proteins as Sensitized by Cardiolipin Hydroperoxide Translocation: MECHANISTIC IMPLICATIONS FOR THE INTRINSIC PATHWAY OF OXIDATIVE APOPTOSIS“. *Journal of Biological Chemistry* 286 (30) (červen 3): 26334–26343. doi:10.1074/jbc.M110.188516.
- Kraegen, E W, J A Sowden, M B Halstead, P W Clark, K J Rodnick, D J Chisholm, a D E James. 1993. „Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting,

- insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4". *The Biochemical journal* 295 (Pt 1) (říjen 1): 287–293.
- Kramer, Henning F., Carol A. Witczak, Eric B. Taylor, Nobuharu Fujii, Michael F. Hirshman, a Laurie J. Goodyear. 2006. „AS160 Regulates Insulin- and Contraction-stimulated Glucose Uptake in Mouse Skeletal Muscle". *Journal of Biological Chemistry* 281 (42) (říjen 20): 31478–31485. doi:10.1074/jbc.M605461200.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, a Catherine Brenner. 2007. „Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death". *Physiological Reviews* 87 (1) (leden 1): 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006.
- Kumar, Chandra C., a Vincent Madison. 2005. „AKT Crystal Structure and AKT-specific Inhibitors". *Oncogene* 24 (50): 7493–7501. doi:10.1038/sj.onc.1209087.
- Kuwahara, K, Y Saito, I Kishimoto, Y Miyamoto, M Harada, E Ogawa, I Hamanaka, et al. 2000. „Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes". *Journal of molecular and cellular cardiology* 32 (8) (srpen): 1385–1394. doi:10.1006/jmcc.2000.1177.
- Li, Peng, Deepak Nijhawan, Imawati Budihardjo, Srinivasa M Srinivasula, Manzoor Ahmad, Emad S Alnemri, a Xiaodong Wang. 1997. „Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade". *Cell* 91 (4) (listopad 14): 479–489. doi:10.1016/S0092-8674(00)80434-1.
- Li, Q, B Li, X Wang, A Leri, K P Jana, Y Liu, J Kajstura, R Baserga, a P Anversa. 1997. „Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy". *The Journal of clinical investigation* 100 (8) (říjen 15): 1991–1999. doi:10.1172/JCI119730.
- Lietzke, S E, S Bose, T Cronin, J Klarlund, A Chawla, M P Czech, a D G Lambright. 2000. „Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains". *Molecular cell* 6 (2) (srpen): 385–394.
- Lopaschuk, Gary D., John R. Ussher, Clifford D. L. Folmes, Jagdip S. Jaswal, a William C. Stanley. 2010. „Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease". *Physiological Reviews* 90 (1) (leden 1): 207–258. doi:10.1152/physrev.00015.2009.
- LoPiccolo, Jaelyn, Gideon M. Blumenthal, Wendy B. Bernstein, a Phillip A. Dennis. 2008. „Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations". *Drug Resistance Updates* 11 (1–2): 32–50. doi:10.1016/j.drug.2007.11.003.
- Majewski, N., V. Nogueira, R. B. Robey, a N. Hay. 2003. „Akt Inhibits Apoptosis Downstream of BID Cleavage via a Glucose-Dependent Mechanism Involving Mitochondrial Hexokinases". *Molecular and Cellular Biology* 24 (2) (prosinec 30): 730–740. doi:10.1128/MCB.24.2.730-740.2004.
- Majewski, Nathan, Veronique Nogueira, Prashanth Bhaskar, Platina E. Coy, Jennifer E. Skeen, Kathrin Gottlob, Navdeep S. Chandel, Craig B. Thompson, R. Brooks Robey, a Nissim Hay. 2004. „Hexokinase-Mitochondria Interaction Mediated by Akt Is Required to Inhibit Apoptosis in the Presence or Absence of Bax and Bak". *Molecular Cell* 16 (5) (prosinec 3): 819–830. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.014.
- Manning, Brendan D., a Lewis C. Cantley. 2007. „AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream". *Cell* 129 (7) (červen 29): 1261–1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Matsui, Takashi, Ling Li, Federica del Monte, Yasuhisa Fukui, Thomas F. Franke, Roger J. Hajjar, a Anthony Rosenzweig. 1999. „Adenoviral Gene Transfer of Activated Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Akt Inhibits Apoptosis of Hypoxic Cardiomyocytes In Vitro". *Circulation* 100 (23) (prosinec 7): 2373–2379. doi:10.1161/01.CIR.100.23.2373.
- Matsui, Takashi, a Anthony Rosenzweig. 2005. „Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (1) (leden): 63–71. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.11.005.
- Matsui, Takashi, Jingzang Tao, Federica del Monte, Kyung-Han Lee, Ling Li, Michael Picard, Thomas L. Force, Thomas F. Franke, Roger J. Hajjar, a Anthony Rosenzweig. 2001. „Akt Activation Preserves Cardiac Function and Prevents Injury After Transient Cardiac Ischemia In Vivo". *Circulation* 104 (3): 330–335. doi:10.1161/01.CIR.104.3.330.

- Maurer, Ulrich, Céline Charvet, Allan S. Wagman, Emmanuel Dejardin, a Douglas R. Green. 2006. „Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1“. *Molecular Cell* 21 (6) (březen 17): 749–760. doi:10.1016/j.molcel.2006.02.009.
- Miao, W, Z Luo, R N Kitsis, a K Walsh. 2000. „Intracoronary, adenovirus-mediated Akt gene transfer in heart limits infarct size following ischemia-reperfusion injury in vivo“. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32 (12) (prosinec): 2397–2402. doi:10.1006/jmcc.2000.1283.
- Milburn, Christine C, Maria Deak, Sharon M Kelly, Nick C Price, Dario R Alessi, a Daan M F Van Aalten. 2003. „Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change“. *The Biochemical journal* 375 (Pt 3) (listopad 1): 531–538. doi:10.1042/BJ20031229.
- Miyamoto, S, A N Murphy, a J H Brown. 2007. „Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II“. *Cell Death Differ* 15 (3) (prosinec 7): 521–529.
- Miyamoto, Shigeki, Amy L Howes, John W Adams, Gerald W Dorn 2nd, a Joan Heller Brown. 2005. „Ca²⁺ dysregulation induces mitochondrial depolarization and apoptosis: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and AKT“. *The Journal of biological chemistry* 280 (46) (listopad 18): 38505–38512. doi:10.1074/jbc.M505223200.
- Miyamoto, Shigeki, Anne N. Murphy, a Joan Heller Brown. 2009. „Akt mediated mitochondrial protection in the heart“. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41 (2) (duben): 169–180. doi:10.1007/s10863-009-9205-y.
- Miyamoto, Shigeki, Marta Rubio, a Mark A. Sussman. 2009. „Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes“. *Cardiovascular Research* 82 (2) (květen 1): 272–285. doi:10.1093/cvr/cvp087.
- Morisco, Carmine, Koichi Seta, Stefan E. Hardt, Youngsook Lee, Stephen F. Vatner, a Junichi Sadoshima. 2001. „Glycogen Synthase Kinase 3 β Regulates GATA4 in Cardiac Myocytes“. *Journal of Biological Chemistry* 276 (30) (červenec 27): 28586–28597. doi:10.1074/jbc.M103166200.
- Muraski, John A, Marcello Rota, Yu Misao, Jenna Fransioli, Christopher Cottage, Natalie Gude, Grazia Esposito, et al. 2007. „Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt“. *Nature medicine* 13 (12) (prosinec): 1467–1475. doi:10.1038/nm1671.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, a K. A. Reimer. 1986. „Preconditioning with Ischemia: a Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium.“ *Circulation* 74 (5) (leden 11): 1124–1136. doi:10.1161/01.CIR.74.5.1124.
- Negoro, S, H Oh, E Tone, K Kunisada, Y Fujio, K Walsh, T Kishimoto, a K Yamauchi-Takahara. 2001. „Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction“. *Circulation* 103 (4) (leden 30): 555–561.
- Newmeyer, Donald D, a Shelagh Ferguson-Miller. 2003. „Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death“. *Cell* 112 (4): 481–490. doi:10.1016/S0092-8674(03)00116-8.
- Nicholson, Karleen M, a Neil G Anderson. 2002. „The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy“. *Cellular Signalling* 14 (5) (květen): 381–395. doi:10.1016/S0898-6568(01)00271-6.
- Nishino, Yasuhiro, Ian G. Webb, Sean M. Davidson, Aminul I. Ahmed, James E. Clark, Sebastien Jacquet, Ajay M. Shah, et al. 2008. „Glycogen Synthase Kinase-3 Inactivation Is Not Required for Ischemic Preconditioning or Postconditioning in the Mouse“. *Circulation Research* 103 (3) (leden 8): 307–314. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.169953.
- Nutt, Leta K., Abujiang Pataer, Jessica Pahler, Bingliang Fang, Jack Roth, David J. McConkey, a Stephen G. Swisher. 2002. „Bax and Bak Promote Apoptosis by Modulating Endoplasmic Reticular and Mitochondrial Ca²⁺ Stores“. *Journal of Biological Chemistry* 277 (11) (březen 15): 9219–9225. doi:10.1074/jbc.M106817200.
- Oudit, Gavin Y, Hui Sun, Benoit-Gilles Kerfant, Michael A Crackower, Josef M Penninger, a Peter H Backx. 2004. „The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology

- and disease". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (2) (srpen): 449–471. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.015.
- Pastorino, John G., Jan B. Hoek, a Nataly Shulga. 2005. „Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 β Disrupts the Binding of Hexokinase II to Mitochondria by Phosphorylating Voltage-Dependent Anion Channel and Potentiates Chemotherapy-Induced Cytotoxicity". *Cancer Research* 65 (22) (listopad 15): 10545–10554. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1925.
- Pastorino, John G., Nataly Shulga, a Jan B. Hoek. 2002. „Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis". *Journal of Biological Chemistry* 277 (9) (leden 3): 7610–7618. doi:10.1074/jbc.M109950200.
- Patten, Richard D., Isaac Pourati, Mark J. Aronovitz, Jason Baur, Flore Celestin, Xin Chen, Ashour Michael, et al. 2004. „17 β -Estradiol Reduces Cardiomyocyte Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling". *Circulation Research* 95 (7) (leden 10): 692–699. doi:10.1161/01.RES.0000144126.57786.89.
- Pedram, Ali, Mahnaz Razandi, Mark Aitkenhead, a Ellis R. Levin. 2005. „Estrogen Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy in Vitro ANTAGONISM OF CALCINEURIN-RELATED HYPERTROPHY THROUGH INDUCTION OF MCIP1". *Journal of Biological Chemistry* 280 (28) (červenec 15): 26339–26348. doi:10.1074/jbc.M414409200.
- Pinton, P., a R. Rizzuto. 2006. „Bcl-2 and Ca²⁺ Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum". *Cell Death & Differentiation* 13 (8): 1409–1418. doi:10.1038/sj.cdd.4401960.
- Postic, C., A. Leturque, R. L. Printz, P. Maulard, M. Loizeau, D. K. Granner, a J. Girard. 1994. „Development and Regulation of Glucose Transporter and Hexokinase Expression in Rat". *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 266 (4) (leden 4): E548–E559.
- Poupa, O, K Krofta, J Prochazka, a Z Turek. 1966. „Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis". *Federation proceedings* 25 (4) (srpen): 1243–1246.
- Powers, S K, H A Demirel, H K Vincent, J S Coombes, H Naito, K L Hamilton, R A Shanely, a J Jessup. 1998. „Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat". *The American journal of physiology* 275 (5 Pt 2) (listopad): R1468–1477.
- Rasola, Andrea, a Paolo Bernardi. 2007. „The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis". *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 12 (5) (květen): 815–833. doi:10.1007/s10495-007-0723-y.
- Reed, John C. 2008. „Bcl-2–family Proteins and Hematologic Malignancies: History and Future Prospects". *Blood* 111 (7) (leden 4): 3322–3330. doi:10.1182/blood-2007-09-078162.
- Reed, John C., a Giovanni Paternostro. 1999. „Postmitochondrial Regulation of Apoptosis During Heart Failure". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (14) (červen 7): 7614–7616. doi:10.1073/pnas.96.14.7614.
- Reiss, K, J Kajstura, X Zhang, P Li, E Szoke, G Olivetti, a P Anversa. 1994. „Acute myocardial infarction leads to upregulation of the IGF-1 autocrine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes". *Experimental cell research* 213 (2) (srpen): 463–472. doi:10.1006/excr.1994.1224.
- Ricci, Craig, Chian Ju Jong, a Stephen W Schaffer. 2008. „Proapoptotic and antiapoptotic effects of hyperglycemia: role of insulin signaling". *Canadian journal of physiology and pharmacology* 86 (4) (duben): 166–172. doi:10.1139/Y08-021.
- Riddle, Suzette R., Aftab Ahmad, Shama Ahmad, Samir S. Deeb, Mari Malkki, B. Kelly Schneider, Corrie B. Allen, a Carl W. White. 2000. „Hypoxia Induces Hexokinase II Gene Expression in Human Lung Cell Line A549". *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 278 (2) (leden 2): L407–L416.
- Rimerman, Ronald A., Anna Gellert-Randleman, a J. Alan Diehl. 2000. „Wnt1 and MEK1 Cooperate to Promote Cyclin D1 Accumulation and Cellular Transformation". *Journal of Biological Chemistry* 275 (19) (prosinec 5): 14736–14742. doi:10.1074/jbc.M910241199.
- Sano, Hiroyuki, Susan Kane, Eiko Sano, Charles W. Garner, a Gustav E. Lienhard. 2003. „Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation". *Journal of Biological Chemistry* 278 (17) (duben 25): 14599–14602. doi:10.1074/jbc.C300063200.

- Santi, Stacey A, a Hoyun Lee. 2010. „The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations“. *American journal of physiology. Cell physiology* 298 (3) (březen): C580–591. doi:10.1152/ajpcell.00375.2009.
- Sarbassov, D D, David A Guertin, Siraj M Ali, a David M Sabatini. 2005. „Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex“. *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712) (únor 18): 1098–1101. doi:10.1126/science.1106148.
- Scorrano, Luca, a Stanley J. Korsmeyer. 2003. „Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (3) (květen 9): 437–444. doi:10.1016/S0006-291X(03)00615-6.
- Semenza, Gregg L. 2003. „Targeting HIF-1 for cancer therapy“. *Nature reviews. Cancer* 3 (10) (říjen): 721–732. doi:10.1038/nrc1187.
- Shulman, R. G., G. Bloch, a D. L. Rothman. 1995. „In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19) (září 12): 8535.
- Schorlemmer, Anita, Michelle L Matter, a Ralph V Shohet. 2008. „Cardioprotective signaling by endothelin“. *Trends in cardiovascular medicine* 18 (7) (říjen): 233–239. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.005.
- Snabaitis, Andrew K., Friederike Cuello, a Metin Avkiran. 2008. „Protein Kinase B/Akt Phosphorylates and Inhibits the Cardiac Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1“. *Circulation Research* 103 (8) (říjen 10): 881–890. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.175877.
- Staal, S. P. 1987. „Molecular Cloning of the Akt Oncogene and Its Human Homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a Primary Human Gastric Adenocarcinoma“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (14) (leden 7): 5034–5037.
- Starkov, Anatoly A, Christos Chinopoulos, a Gary Fiskum. 2004. „Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury“. *Cell calcium* 36 (3-4) (říjen): 257–264. doi:10.1016/j.ceca.2004.02.012.
- Sun, D., N. Nguyen, T. R. DeGrado, M. Schwaiger, a F. C. Brosius. 1994. „Ischemia Induces Translocation of the Insulin-responsive Glucose Transporter GLUT4 to the Plasma Membrane of Cardiac Myocytes“. *Circulation* 89 (2) (leden 2): 793–798. doi:10.1161/01.CIR.89.2.793.
- Sun, L., S. Shukair, T. J. Naik, F. Moazed, a H. Ardehali. 2007. „Glucose Phosphorylation and Mitochondrial Binding Are Required for the Protective Effects of Hexokinases I and II“. *Molecular and Cellular Biology* 28 (3) (listopad 26): 1007–1017. doi:10.1128/MCB.00224-07.
- Sussman, Mark. 2007. „“AKT”ing Lessons for Stem Cells: Regulation of Cardiac Myocyte and Progenitor Cell Proliferation“. *Trends in Cardiovascular Medicine* 17 (7) (říjen): 235–240. doi:10.1016/j.tcm.2007.08.003.
- Sussman, Mark A., Mirko Völkers, Kimberlee Fischer, Brandi Bailey, Christopher T. Cottage, Shabana Din, Natalie Gude, et al. 2011. „Myocardial AKT: The Omnipresent Nexus“. *Physiological Reviews* 91 (3) (leden 7): 1023–1070. doi:10.1152/physrev.00024.2010.
- Szado, Tania, Veerle Vanderheyden, Jan B Parys, Humbert De Smedt, Katja Rietdorf, Larissa Kotelevets, Eric Chastre, et al. 2008. „Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7) (únor 19): 2427–2432. doi:10.1073/pnas.0711324105.
- Taniyama, Yoshiaki, Masahiro Ito, Kaori Sato, Christoph Kuester, Kerstin Veit, Gunter Tremp, Ronglih Liao, et al. 2005. „Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (2): 375–385. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.12.002.
- Tian, Rong, a E. Dale Abel. 2001. „Responses of GLUT4-Deficient Hearts to Ischemia Underscore the Importance of Glycolysis“. *Circulation* 103 (24) (červen 19): 2961–2966. doi:10.1161/01.CIR.103.24.2961.
- Tong, Haiyan, Kenichi Imahashi, Charles Steenbergen, a Elizabeth Murphy. 2002. „Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 β During Preconditioning Through a Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Pathway Is Cardioprotective“. *Circulation Research* 90 (4) (srpen 3): 377–379. doi:10.1161/01.RES.0000012567.95445.55.

- Torella, Daniele, Marcello Rota, Daria Nurzynska, Ezio Musso, Alyssa Monsen, Isao Shiraishi, Elias Zias, et al. 2004. „Cardiac Stem Cell and Myocyte Aging, Heart Failure, and Insulin-Like Growth Factor-1 Overexpression“. *Circulation Research* 94 (4) (květen 3): 514–524. doi:10.1161/01.RES.0000117306.10142.50.
- Toschi, Alfredo, Evan Lee, Noga Gadir, Michael Ohh, a David A Foster. 2008. „Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2“. *The Journal of biological chemistry* 283 (50) (prosinec 12): 34495–34499. doi:10.1074/jbc.C800170200.
- Tschopp, Oliver, Zhong-Zhou Yang, Daniela Brodbeck, Bettina A. Dümmler, Maja Hemmings-Mieszczak, Takashi Watanabe, Thomas Michaelis, Jens Frahm, a Brian A. Hemmings. 2005. „Essential Role of Protein Kinase B (PKB/Akt3) in Postnatal Brain Development but Not in Glucose Homeostasis“. *Development* 132 (13) (leden 7): 2943–2954. doi:10.1242/dev.01864.
- Uchiyama, T., N. Maulik, a D. K. Das. 2004. „Role of akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36 (4) (duben): 621–622.
- Wang, Peipei, Steven G. Lloyd, Huadong Zeng, Arend Bonen, a John C. Chatham. 2005. „Impact of Altered Substrate Utilization on Cardiac Function in Isolated Hearts from Zucker Diabetic Fatty Rats“. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 288 (5) (leden 5): H2102–H2110. doi:10.1152/ajpheart.00935.2004.
- Wang, Z, N Bhattacharya, M Weaver, K Petersen, M Meyer, L Gapter, a N S Magnuson. 2001. „Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis“. *Journal of veterinary science* 2 (3) (prosinec): 167–179.
- Weiss, James N., Paavo Korge, Henry M. Honda, a Peipei Ping. 2003. „Role of the Mitochondrial Permeability Transition in Myocardial Disease“. *Circulation Research* 93 (4) (srpen 22): 292–301. doi:10.1161/01.RES.0000087542.26971.D4.
- Wilson, John E. 2003. „Isozymes of Mammalian Hexokinase: Structure, Subcellular Localization and Metabolic Function“. *Journal of Experimental Biology* 206 (12) (červen 15): 2049–2057. doi:10.1242/jeb.00241.
- Xing, Wenjuan, Wenjun Yan, Feng Fu, Yulan Jin, Lele Ji, Wenchong Liu, Li Wang, et al. 2009. „Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function“. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 14 (9) (září): 1050–1060. doi:10.1007/s10495-009-0378-y.
- Yamaguchi, H, a H G Wang. 2001. „The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change“. *Oncogene* 20 (53) (listopad 22): 7779–7786. doi:10.1038/sj.onc.1204984.
- Yamashita, Kazuhito, Jan Kajstura, Daryl J. Discher, Bernard J. Wasserlauf, Nanette H. Bishopric, Piero Anversa, a Keith A. Webster. 2001. „Reperfusion-Activated Akt Kinase Prevents Apoptosis in Transgenic Mouse Hearts Overexpressing Insulin-Like Growth Factor-1“. *Circulation Research* 88 (6) (březen 30): 609–614. doi:10.1161/01.RES.88.6.609.
- Yang, Jing, Peter Cron, Vivienne Thompson, Valerie M. Good, Daniel Hess, Brian A. Hemmings, a David Barford. 2002. „Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation“. *Molecular Cell* 9 (6): 1227–1240. doi:10.1016/S1097-2765(02)00550-6.
- Yang, Zhong-Zhou, Oliver Tschopp, Nicolas Di-Poi, Elisabeth Bruder, Anne Baudry, Bettina Dümmler, Walter Wahli, a Brian A Hemmings. 2005. „Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice“. *Molecular and cellular biology* 25 (23) (prosinec): 10407–10418. doi:10.1128/MCB.25.23.10407-10418.2005.
- Zuurbier, Coert J., Otto Eerbeek, a Alfred J. Meijer. 2005. „Ischemic Preconditioning, Insulin, and Morphine All Cause Hexokinase Redistribution“. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 289 (1) (leden 7): H496–H499. doi:10.1152/ajpheart.01182.2004.

INTERNETOVÉ ZDROJE A PUBLIKACE

World Health Organization <http://www.who.int/en/>

S. Silbernagl, A. Despopoulos: Atlas fyziologie člověka, 6. vydání, Grada Publishing, a.s., 2004